

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

Departamento de Anatomía y Anatomía Patológica Comparada



TESIS DOCTORAL

**Ultraestructura, distribución, cuantificación de cuerpos
mamilares y fibras en relación con la viabilidad embrionaria
del águila perdicera ("Hieraaetus fasciatus")**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Juan Manuel Blanco Portillo

DIRECTOR:

María José Blázquez Layunta

Madrid, 2015

3748090X

AN72819
Puerta

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Facultad de Veterinaria.

**Departamento de Anatomía y Anatomía
Patológica Comparada.**

**ULTRAESTRUCTURA, DISTRIBUCIÓN,
CUANTIFICACIÓN DE CUERPOS MAMILARES Y
FIBRAS EN RELACIÓN CON LA VIABILIDAD
EMBRIONARIA DEL ÁGUILA PERDICERA (Hieraaetus
fasciatus)**

**Memoria presentada por
JUAN MANUEL BLANCO PORTILLO
Para optar al grado de doctor en veterinaria
Madrid, 2001.**

**Dña. M^a JOSÉ BLÁNQUEZ LAYUNTA, PROFESORA TITULAR DEL
DEPARTAMENTO DE ANATOMÍA Y ANATOMÍA PATOLÓGICA
COMPARADAS DE LA FACULTAD DE VETERINARIA DE LA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

CERTIFICA:

Que la tesis doctoral que tiene por título **ULTRAESTRUCTURA, DISTRIBUCIÓN, CUANTIFICACIÓN DE CUERPOS MAMILARES Y FIBRAS EN RELACIÓN CON LA VIABILIDAD EMBRIONARIA DEL ÁGUILA PERDICERA (*Hieraaetus fasciatus*)**, de la que es autor el licenciado en veterinaria, **D. JUAN MANUEL BLANCO PORTILLO**, se ha realizado bajo mi dirección en el Departamento de Anatomía y Anatomía Patológica Comparadas de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid, el Centro de Estudios de Rapaces Ibéricas de la Junta de Comunidades de Castilla - La Mancha y el Avian Germplasm and Gamete Physiology Laboratory del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos en Beltsville. De forma adicional se ha contado con la valiosa colaboración del Centro de Microscopía Electrónica Luis Brú de la Universidad Complutense de Madrid, el Departamento de Ecotoxicología del Institute of Terrestrial Ecology, UK y la Universidade do Algarve.

Y para que conste a todos los efectos oportunos, firmo en

Madrid, 10 de Diciembre del 2000.

Fdo. M^a José Blánquez Layunta

**A Ursula y a mis padres, sufridores de
mi obsesión por conservar las rapaces**

AGRADECIMIENTOS

La regresión de las especies animales en peligro es, a menudo, un problema multifactorial. En la actualidad, la investigación de las causas requiere sin duda una aproximación multidisciplinar. Sólo mediante el concurso y colaboración de diferentes centros especializados en áreas concretas de la ciencia es posible dar respuesta a los interrogantes. Son tantos los profesionales y amigos que han hecho posible este estudio que resultará difícil no pecar de injusto olvidando a alguno de ellos.

Gracias es poco para reconocer a la Dra. Dña. M^a José Blánquez Layunta su incondicional apoyo en lo científico y en lo humano. Sin su ciega confianza en mi, su sabiduría y consejos jamás hubiera concluido este trabajo.

Un millón de gracias al Profesor D. Javier Puerta. Sus enseñanzas sobre embriología de las aves y su preocupación por la conservación de las especies amenazadas han sido de enorme ayuda, fomentando mi interés por este campo.

Mi más sincero agradecimiento al Dr. Luis Palma, profesor de la Universidade do Algarve y reconocido experto en la biología y ecología del águila perdicera en Portugal. Sin su experiencia, sabios consejos y trabajo de compilación de muestras, no hubiera sido posible la realización de este estudio. Mi más sincero reconocimiento y mi gratitud personal, no sólo a sus conocimientos sino también a sus esfuerzos en la conservación de la especie.

Gracias al Dr. Ramesh Ramachedan por sus enseñanzas en el campo de la programación y análisis de imagen asistido por ordenador. A él y al Profesor John Proudman, Director del Department of Endocrinology, USDA, por permitir el acceso a sus ordenadores durante largas sesiones de trabajo.

Al Dr. Wess Gardner sin cuya inestimable ayuda no hubiera sido posible el procesamiento, digitalización y archivo de más de seiscientas imágenes de microscopía electrónica.

Gracias al Dr. Ignacio Fernandez Figares no sólo por su arduo trabajo en el análisis estadístico de los datos generados, sino además por su entrañable amistad, consejo y ánimo en los momentos duros. Al Dr. Tom Caperna, Department of Animal Nutrition, USDA, por la libertad de utilizar sus soportes informáticos.

Al Dr. David Wildt, Director científico del Conservation and Research Center y al Smithsonian Institution, institución a la que representa, por posibilitar económicamente mi estancia de investigación de dos años en USA.

A la Dra Ann Donoghue, responsable del Avian Germplasm and Gamete Physiology Laboratory por su aportación en el terreno científico, y por permitirme trabajar con entera libertad en las instalaciones de su laboratorio.

Al Profesor Murray Bakst, Director del Poultry Research Laboratory, por su inestimable ayuda en la consecución de algunos de los valiosos textos antiguos para una completa revisión bibliográfica, y la supervisión en el campo de la microscopía electrónica.

Al Dr. George Gee, Director del Avian Physiology Department, Patuxent Wildlife Research Center, USGS, por sus sugerencias en el campo de la anatomía comparada de la cáscara y membranas testáceas en especies silvestres y generosa hospitalidad.

Al Dr. David Ellis, por su amistad y valiosa colaboración en la búsqueda de muestras de cáscara en centros de investigación de Norte América.

Al Dr. Ian Newton del Institute of Terrestrial Ecology, por sus consejos y sugerencias en los estudios ultraestructurales.

Al personal técnico del Centro de Microscopía Luis Bru y en especial a Alfonso por su experiencia y buen hacer durante las innumerables sesiones de trabajo, y a su Director D. Luis Puebla por el interés mostrado.

A todos los biólogos, veterinarios e investigadores portugueses que han posibilitado este trabajo. En especial a Barbara Fraguas, Pedro Bella y Pedro Melo, por su ayuda y amistad, además de su excelencia como embajadores y guías del hermoso país vecino.

Gracias sinceras a Bernardo Arroyo y Ernesto Ferreiro por su amistad, confianza y por compartir sus preocupaciones y conocimientos sobre la conservación de esta especie en Guadalajara.

A Víctor Matarranz y Javier Piris, escaladores profesionales que se jugaron el físico descendiendo por un sin número de cortados para obtener las muestras de la población castellana. Los he visto suspendidos como arañas en el aire realizar su trabajo en tiempo récord con seguridad pasmosa.

Mi cariño y agradecimiento a toda la guardería de Ciudad Real y en especial a Eutimio, Antonio y Pedro sin cuya ayuda hubiera sido imposible concebir este estudio. Ellos conocen mejor que nadie la problemática del águila y fueron los primeros en observar que algo extraño le sucedía.

Gracias a los biólogos Nicolás Guzmán y José Ramos, por su excelente trabajo de seguimiento de las poblaciones y por tantas jornadas de campo escudriñando en la vida del águila perdicera.

Al Servicio de Medio Ambiente de Ciudad y en especial a D. Víctor Díaz por su confianza en la investigación y su riguroso y tenaz trabajo por la conservación de la especie en la provincia de Ciudad Real. Su trabajo es un ejemplo para todos.

Mi gratitud a la Consejería de Medio Ambiente y a su Director General D. Alberto Sáiz por su sensibilidad hacia los problemas de las grandes rapaces en Castilla - La Mancha. A sus técnicos y en especial a D. Rafael Ruiz y D. Javier Martín por su apuesta por la investigación en el área de la conservación.

Gracias a todo el equipo del Centro de Estudios de Rapaces Ibéricas por su comprensión y ánimo en la realización de este estudio.

Gracias a Sophía Fuentes y Heath Harley por su ayuda en la recopilación de bibliografía.

Gracias a mi familia: padres y hermanos, por lo que de santidad conlleva padecer mi obsesión por la conservación de las aves rapaces. Gracias por vuestro calor humano, comprensión, paciencia y en muchos casos financiación. A mi padre, amigo y mecenas, que observa las águilas desde abajo y desde arriba. A mi madre por todo y más...

A Ursula, mi alma gemela, faltan palabras para agradecerte la realización y diagnóstico de los exámenes post-mortem de embriones, el procesado de multitud de cáscaras, tu experiencia en el campo de la patología, tus consejos, tu compañía, tu paciencia, tu aliento,...

A las águilas por soportar nuestras intromisiones en su territorio con estoicismo. Por dejarnos entrar en su vida y mostrarnos la belleza de su mundo. Con la

esperanza de que las conclusiones de nuestras investigaciones y nuestro trabajo puedan ayudar a su conservación.

ÍNDICE

JUSTIFICACIÓN.....	1
OBJETIVOS.....	7
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	9
 I.MORFOLOGÍA: ESTRUCTURA, ULTRAESTRUCTURA, Y	
COMPOSICIÓN DE LA CÁSCARA.....	10
I.1.Matriz orgánica.....	11
I.1.1. Membranas de la cáscara.....	12
I.1.2. Protuberancias o cuerpos mamilares.....	15
I.1.3. Matriz de la cáscara.....	16
I.1.4. Cutícula.....	17
I.1.5. Cubierta mucilaginosa.....	18
I.1.6. Diferencias interespecíficas y particularidades en las	
aves rapaces.....	19
I.2. Capas de cristalización.....	20
I.2.1. Capa mamilar.....	20
I.2.2. Capa de empalizada.....	22
I.2.3. Capa de cristalización externa.....	22
I.2.4. Diferencias interespecíficas.....	22
 II. FORMACIÓN DE LA CASCARA Y PROCESOS METABÓLICOS	
ASOCIADOS.....	24
II.1. Formación de las membranas de la cáscara.....	24
II.2. Calcificación de la cáscara y su regulación.....	24
II.3. Regulación del metabolismo del calcio.....	26
III.3.1. Fuentes de calcio.....	26
III.3.2. Regulación hormonal y renal del calcio.....	27
III.3.3. Metabolismo de la vitamina D.....	28
III.3.4. Movilización del calcio óseo.....	29

III. POROS E INTERCAMBIO GASEOSO.	29
III.1. Morfología, estructura y función de los poros.	29
III.2. Conductancia y variaciones interespecíficas.	31
IV. CÁSCARA Y DESARROLLO EMBRIONARIO.	33
IV.1.Oxígeno: disponibilidad, consumo y desarrollo embrionario.	33
IV.2.Metabolismo y regulación del transporte del calcio.	34
V. FACTORES QUE INFLUYEN EN LA FORMACIÓN, ESTRUCTURA Y COMPOSICIÓN DE LA CASCARA.	35
V.1. Fisiológicos y de manejo.	35
V.2. Genéticos y de desarrollo embrionario.	36
V.3. Nutricionales.	37
V.3.1. Hipo e hipervitaminosis.	37
V.3.2. Deficiencias y excesos minerales.	38
V.3.3. Lípidos y aminoácidos.	40
V.3.4. Derivados de plantas y microorganismos.	40
V.4. Ambientales.	41
V.4.1. Temperatura y altitud.	41
V.4.2. Ecotoxicológicos.	42
V.5. Iatrogénicas.	46
V.6. Infecciosas.	47
VI. MÉTODOS DE EVALUACIÓN DE LA CALIDAD DE LA CÁSCARA.	48
VI.1. Físicos y Químicos.	48
VI.2. Morfológicos y estructurales.	49

MATERIAL Y MÉTODOS.	51
I. MATERIAL BIOLÓGICO.	52
II. PROBLEMÁTICA DETECTADA.	56
III. AREAS GEOGRÁFICAS OBJETO DE ESTUDIO.	58
IV. PERIODO DE ESTUDIO.	59
V. CRITERIOS DE SELECCIÓN Y PARÁMETROS REPRODUCTIVOS DE PAREJAS EXAMINADAS.	60
VI. TOMA DE MUESTRAS, TIPO Y CLASIFICACIÓN.	61
VII. CARACTERÍSTICAS ESTRUCTURALES NORMALES, VALORES DE REFERENCIA Y CORRELACIÓN ENTRE MAGNITUDES.	63
VI.1. Tratamiento y análisis ultraestructural de la muestra.	63
VI.1.1. Localización y extracción.	63
VI.1.2. Preparación para análisis mediante microscopía electrónica de barrido y registro gráfico.	64
VI.2. Obtención de medidas y análisis de imagen asistido por ordenador.	66
VI.3. Establecimiento de valores de referencia de la especie.	73
VI.3.1. Criterios de selección.	73
VI.3.2. Establecimiento de valores de referencia.	74
VI.4. Tendencias y correlaciones entre magnitudes.	74
VIII. VARIACIÓN DE LOS PARÁMETROS ESTABLECIDOS EN FUNCIÓN DE FACTORES FISIOLÓGICOS, INDIVIDUALES, GEOGRÁFICOS Y CLIMATOLÓGICOS, GENÉTICOS E INMUNOLÓGICOS.	75
IX. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE TÓXICOS AMBIENTALES EN CONTENIDO DE HUEVOS COMO BIOINDICADORES.	78
VIII.1. Preparación de la muestra.	78
VIII.2. Análisis toxicológico.	78
VIII.2.1. Organoclorados.	79

VIII.2.2. Bifenilos policlorados.	81
VIII.2.3. Metales pesados.	82
VIII.3. Análisis estadístico.	83
X. DOCUMENTACIÓN DE ESTADIOS EMBRIONARIOS Y RELACIÓN CON PARÁMETROS ULTRAESTRUCTURALES.	84
IX.1. Criterios de selección de embriones.	84
IX.2. Toma de medidas y obtención de valores de referencia. Clasificación de estadios embrionarios.	84
IX.3. Relación con parámetros ultraestructurales y análisis estadístico.	86
RESULTADOS.	87
I. CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS Y ULTRAESTRUCTURALES NORMALES DE LA CÁSCARA, ESTABLECIMIENTO DE VALORES DE REFERENCIA Y CORRELACIÓN ENTRE MAGNITUDES.	88
I.1. Características de la muestra obtenida.	88
I.2. Establecimiento de valores de referencia de la especie para las magnitudes descritas.	89
I.2.1. Tamaño de la muestra seleccionada.	89
I.2.2. Establecimiento de valores de referencia.	89
I.3. Tendencias y correlaciones entre variables cuantitativas y no cuantitativas.	112
II. DETERMINACIÓN DE LA VARIACIÓN DE LOS PARÁMETROS ESTABLECIDOS EN FUNCIÓN, GEOGRÁFICOS Y CLIMATOLÓGICOS, GENÉTICOS E INMUNOLÓGICOS.	124
II.1. Factores geográficos y climatológicos.	124
II.1.1. Núcleo poblacional.	124
II.1.2. Altitud del área de cría.	126
II.2. Factores genéticos e individuales.	126

II.3. Factores inmunológicos e infecciosos.	127
III. DESCRIPCIÓN DE ALTERACIONES ULTRA- ESTRUCTURALES.	128
IV. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE TÓXICOS AMBIENTALES EN CONTENIDO DE HUEVOS COMO BIOINDICADORES.	134
IV.1. Tamaño de la muestra analizada.	134
IV.2. Análisis toxicológico.	134
IV.2.1. Organoclorados.	134
IV.2.2. Bifenilos policlorados.	140
IV.2.3. Estudio de los niveles de Mercurio.	140
IV.3. Estudio comparativo entre poblaciones.	142
IV.4. Relación de los niveles de tóxicos entre sí y con los parámetros ultraestructurales de la cáscara.	143
V. DOCUMENTACIÓN DE ESTADÍOS EMBRIONARIOS Y RELACIÓN CON PARÁMETROS ULTRAESTRUCTURALES.	144
V.1. Tamaño y características de la muestra.	144
V.2. Características de los diferentes estadios embrionarios.	145
V.3. Correlación entre parámetros de desarrollo.	149
V.4. Correlación entre desarrollo embrionario y parámetros de la cascara. .	150
DISCUSIÓN.	152
I. CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS Y ULTRAESTRUCTURALES, VALORES DE REFERENCIA Y CORRELACIÓN ENTRE MAGNITUDES.	153
I.1. Valores de referencia para la especie.	153
I.2. Tendencias y correlaciones entre magnitudes.	169
II. VARIACIÓN DE LOS PARÁMETROS ESTABLECIDOS EN FUNCIÓN DE FACTORES FISIOLÓGICOS, INDIVIDUALES,	

GEOGRÁFICOS Y CLIMATOLÓGICOS, GENÉTICOS E INMUNOLÓGICOS.	177
II.1. Factores fisiológicos.	177
II.1.1. Edad de la hembra.	177
II.1.2. Estado nutricional.	179
II.1.3. Grado de estrés.	181
II.2. Factores geográficos y climatológicos.	182
II.2.1. Nucleo poblacional.	182
II.2.2. Temperatura durante los días de puesta.	184
II.2.3. Altitud del área de cría.	184
II.3. Factores genéticos e individuales.	185
II.4. Factores inmunológicos e infecciosos.	186
III. DESCRIPCIÓN DE ALTERACIONES ULTRAESTRUCTURALES.	186
IV. TÓXICOS AMBIENTALES EN CONTENIDO DE HUEVOS COMO BIOINDICADORES.	189
IV.1. Análisis toxicológico.	189
IV.1.1. Organoclorados.	189
IV.1.2. Bifenilos policlorados.	192
IV.1.3. Mercurio.	192
IV.2. Tóxicos y aspectos ultraestructurales de la cáscara y membranas testáceas.	194
V. DOCUMENTACIÓN DE ESTADÍOS EMBRIONARIOS Y RELACIÓN CON PARÁMETROS ULTRAESTRUCTURALES.	196
V.1. Causas de posibles anomalías en el desarrollo embrionario detectadas en el águila perdicera.	196
V.2. Desarrollo embrionario y parámetros ultraestructurales de la cáscara.	199
V.3. Tiempo de incubación y desarrollo embrionario.	200

CONCLUSIONES.....	202
RESUMEN.	205
SUMMARY.....	208
BIBLIOGRAFÍA	210
FIGURAS	
ANEXO FOTOGRÁFICO	

JUSTIFICACIÓN

Nací fascinado por el mundo de las aves rapaces. El huevo de las aves, quizá por su aparente simplicidad e independencia, siempre me ha parecido un éxito evolutivo. Sin embargo, los años de observación del comportamiento materno en las aves, y mis estudios sobre incubación artificial han convertido mi creencia en una duda razonable. Citaremos algunos ejemplos que motivan nuestra duda. Variaciones mínimas en la humedad relativa del aire en la sala de incubación, repercuten de forma inmediata en la pérdida diaria de peso del huevo. Rotaciones inadecuadas en número o grados, dan lugar a un aumento en la incidencia de malposiciones y mortalidad embrionaria. Excesos o defectos en la temperatura producen un efecto similar.

¿Cómo puede la hembra controlar esta ingente cantidad de factores?. En mi corta experiencia he visto a hembras de águila raspar la superficie del huevo con el pico, quien sabe si para aumentar la conductancia y llevar a buen término el desarrollo embrionario. En ocasiones, las hembras en la naturaleza incuban de forma intermitente en los últimos días, incluso he tenido la oportunidad de verlas dando sombra a los huevos durante un tiempo prudencial.

Los estudios demográficos indican que el águila perdicera ha sufrido una regresión importante durante la pasada y presente década. En 1996, en Castilla - La Mancha, rigurosos estudios de campo, apuntaban la existencia de parejas con un historial de fracaso reproductor constatado. Poníamos entonces en marcha el presente estudio, con el objetivo de investigar algunas de las causas de infertilidad en esta especie. A la amplia y compleja toma de muestras en campo, le siguieron exámenes post-mortem de embriones, lavar, clasificar, procesar,.... Luego vendrían muchas horas de estudios de microscopía electrónica, seguidos de complejos análisis toxicológicos, y de imagen asistido por ordenador realizados durante mis dos años de estancia en Estados Unidos.

No éramos los primeros, y en este trabajo necesitaríamos ayuda. En 1989, se editaba “The avian egg” una obra de los doctores Burley y Vadehra que ha sido de consulta obligada y referencia en este campo en los últimos diez años. En la cuarta línea de su prefacio se hace referencia al estudio científico que sobre el huevo realizaron los doctores Alexis y Anastasia Romanoff, un tratado científico escrito en 1949.

Durante mi estancia en Estados Unidos, gracias a un excelente científico, conseguí tener en mis manos uno de los originales, en su dedicatoria se lee: “A todos los científicos cuyos estudios sobre el huevo han hecho posible escribir este libro”. Esto significaba que los estudios sobre la estructura de la cáscara habían comenzado mucho antes.

Continuando esta visión retrospectiva, en 1892, Collier relaciona por primera vez el calcio con el grosor de la cáscara. En 1871, Von Nathusius indica que el grosor de la cáscara es característico de cada especie y puede utilizarse con criterios taxonómicos. Este autor da a conocer la primera tabla comparativa que aún hoy se emplea como referencia. Comprobé cómo la exhaustiva descripción de la morfología de las membranas testáceas realizada por Thomson en 1859, incluía tres partes dentro de la membrana externa, las mismas que vemos en el águila perdicera en 1999. Fascinante, más de un siglo de riguroso estudio que sin duda ha sido vital para este trabajo.

He de reconocer que la curiosidad me pudo, y la primera vez que abrí el tratado de los Romanoff, lo primero fue indagar sobre los cuerpos mamilares. Como si de una profecía se tratara pude leer: “ las mamilas están estrechamente unidas pared con pared formando un solo estrato. Sus polos están achatados y en los lados tienen como indentaciones que encajan unas con otras, estando además cementadas para formar una rígida, aunque frágil, base para las capas más externas de la cáscara”.

Por aquel tiempo, nada hacía sospechar al autor, que fueran las alteraciones en estas “columnas del edificio”, las que pudieran estar causando problemas en el

águila perdicera como se pone de manifiesto en nuestro estudio. No obstante, en la página anterior de este tratado, aparece un gráfico en el que curiosamente se detalla la estructura de esta capa en el *Aepyornis*, una especie ya extinta cuyo huevo triplica en tamaño al de avestruz.

En los estudios sobre la cáscara, en especies salvajes, la capa de los cuerpos mamilares siempre fue la cenicienta. Los numerosos trabajos sobre los efectos del DDT (Bitman et al, 1969, Grier, 1982), y los postreros sobre PCBs (Peter Lowe), o mercurio (Lundholm, 1995), tan solo informaban de reducciones en el grosor total de la cáscara.

Hubo que esperar hasta 1982, para que Leach y Gross describieran las primeras alteraciones en esta capa. Consistían en la formación de mamilas grandes e irregulares, probablemente debido a la fusión de varias mamilas, durante fases tempranas de la formación del huevo. El hallazgo fue descrito en relación con la deficiencia de manganeso en gallinas. Curiosamente, en el mismo artículo se indaga sobre la composición de la matriz orgánica revelando una disminución de hexosamina y ácido hexurónico. Comienza a tomar relevancia el proceso de biomineralización que da lugar a la cáscara. Hasta entonces las miradas se habían centrado fundamentalmente en el grado de cristalización.

En 1992, Arias y colaboradores realizan una caracterización bioquímica e inmunoquímica de la matriz orgánica indicando que, a nivel de los cuerpos mamilares, se compone fundamentalmente de keratán sulfato y pequeñas cantidades de dermatán sulfato. Gautron y colaboradores (1996), en la introducción a su excepcional trabajo sobre la matriz soluble de la cáscara, citan: “La matriz orgánica facilita la nucleación y regula el crecimiento de los cristales, se considera que contribuye a las propiedades ultraestructurales y cristalográficas del tejido mineralizado”. Un año más tarde, sus trabajos destacan la presencia de diferentes proteínas precursoras de matriz en el fluido uterino, que varían en función del estadio en el proceso de biomineralización.

El presente estudio monográfico, tiene entre sus objetivos, el establecimiento de los valores considerados como normales en la actualidad para ciertos parámetros estructurales en la cáscara del águila perdicera. No fue tarea fácil. En aves domésticas, es bien conocida la variación individual (Romanoff, 1929), genética (Taylor and Martin, 1928), o nutricional (Norris et al, 1934).

Del amplio espectro de muestras obtenidas, se seleccionaron aquellas procedentes de parejas con historial reproductor intachable. A esto añadimos exhaustivos estudios toxicológicos, incluyendo determinación de niveles de PCBs, DDT y metabolitos, metales pesados, etc., con el objeto de eliminar aquellas en las que aparecieran niveles significativos. La segunda parte consistió en un diagnóstico preliminar de la causa de aparente fragilidad de los huevos de ciertas parejas y de la mortalidad embrionaria. Los correspondientes estudios de microscopía electrónica y los trabajos estadísticos pertinentes quedan reflejados en este estudio.

El círculo no se ha cerrado, los resultados de nuestro estudio revelan la cara visible del problema, lo describen y delimitan. No obstante, la causa primaria es todavía una incógnita. La búsqueda continua, y en el momento de escribir esta tesis estamos pendientes de establecer una colaboración con la universidad de Cleveland, Ohio, para estudiar los proteoglicanos en los cuerpos mamilares de la cáscara del águila perdicera.

Mientras tanto, las águilas calvas descendientes de los huevos que, a principios de los ochenta, se incubaron artificialmente debido a la fragilidad ocasionada por el DDT, parecen tener nuevos problemas. Los biólogos han detectado que, tras los tres o cuatro primeros años de reproducción, el éxito reproductor disminuye notablemente en puntos de la costa este americana. Lo contrario sucede de forma normal en aves rapaces.

Como veterinario para fauna amenazada de la Junta de Comunidades de Castilla - La Mancha he podido comprobar el aumento del número de parejas que se reproducen sin éxito en los últimos años. ¿Qué está pasando?, ¿Es éste

fenómeno tan solo parte de un ciclo, o hay algo más detrás?. Es nuestra responsabilidad detectar nuestros errores y corregirlos para que no vuelvan a suceder. Que los que nos preceden puedan seguir pasando tardes inolvidables observando estas majestuosas aves.

OBJETIVOS

1. Describir las características morfológicas y ultraestructurales normales de la cáscara del huevo de águila perdicera (*Hieraaetus fasciatus*), delimitar el rango de los valores de referencia para la especie, estableciendo los patrones normales.
2. Estudiar los factores ecotoxicológicos en el águila perdicera, utilizando el contenido y cáscara de huevos no eclosionados y eclosionados, como bioindicadores.
3. Determinar el grado de correlación entre los parámetros establecidos, y su variación en función de factores: Fisiológicos, individuales, geográficos, y ecotoxicológicos.
4. Describir las alteraciones ultraestructurales de la cáscara presentes en poblaciones de águila perdicera y elaborar hipótesis sobre su posible etiología.
5. Documentar diferentes estadios embrionarios en el águila perdicera. Establecer valores de referencia en medidas predeterminadas representativas, y estudiar su grado de correlación con parámetros morfológicos y ultraestructurales de la cáscara.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

I. MORFOLOGÍA, ESTRUCTURA, ULTRAESTRUCTURA, Y COMPOSICIÓN DE LA CÁSCARA

En 1949 Alexis y Anastasia Romanoff, describen con sumo acierto, la cáscara del huevo de las aves como una cubierta relativamente suave, dura y calcárea, adherida a la superficie externa de dos membranas. Seguidamente, los autores afirman que tan firme es la adhesión, que no pueden separarse sin cierta dificultad. Ambas estructuras están estrechamente relacionadas, pasando a describirse en combinación con la cáscara (Simons y Wiertz, 1963; Vadehra y Nath, 1973; Burley y Vadehra, 1982).

En la última edición de “Avian Physiology” (Sturkey, 1999), Johnson incorpora las membranas de la cáscara como parte de la matriz orgánica de la misma, de modo que seguiremos esta estructura en nuestra revisión bibliográfica.

La cáscara es una estructura mineralizada altamente especializada, que protege al embrión frente a daños físicos, microorganismos, e incluso pequeños predadores. La cáscara es esencial para el desarrollo embrionario, ya que permite un adecuado intercambio gaseoso (Tazawa y Whittow, 1999). Además, posee la conductividad térmica adecuada (Burley y Vadehra, 1982).

Desde el punto de vista de su composición química, la cáscara del huevo de gallina consta de un 97.4% de sólidos, 1.65 % de agua siendo el resto proteínas (incluyendo glycoproteínas) y algunas trazas de lípidos (Romanoff y Romanoff, 1949). Estudios realizados en la cáscara del huevo de avestruz han revelado que contiene hasta un 0.019% de lípidos, en su mayoría fosfolípidos (Kriesten *et al.*, 1979).

Estructuralmente, la cáscara aparece a simple vista como una estructura simple, consistente en una lámina calcificada recubierta en su cara externa por una fina cutícula, y horadada por poros. En su cara interna, posee además dos

membranas descritas por los primeros microscopistas (Baudrimont y Martin-St-Auge, 1847; von Nathusius, 1868). Los estudios de microscopía electrónica han revelado con posterioridad, complicados detalles intuidos por estos investigadores (Carnarius *et al.*, 1996).

La cáscara se forma partiendo de una fracción orgánica que se biomineraliza, mediante el depósito de cristales de carbonato cálcico. Este proceso de biomineralización da lugar a un conglomerado, cuya estructura y composición ocupan el presente capítulo.

I.1. MATRIZ ORGÁNICA

La matriz orgánica incluye las membranas externas de huevo, y constituye aproximadamente un 3.5% del total del peso de la cáscara. La matriz orgánica, dentro de la capa calcificada, representa un 2% (Gautron, 1996) y está básicamente formada por proteínas y polisacáridos ricos en grupos sulfato (Krampitz y Graser, 1988; Arias *et al.*, 1993). Pese a la pequeña fracción que representan en el total de la cáscara, su presencia es crítica en la formación y resistencia de la misma.

Tras la descalcificación, las fracciones solubles e insolubles han sido disociadas en distintas proteínas (Hincke *et al.*, 1992). Proteínas como la ovocleidina han sido purificadas hasta la homogeneidad (Hincke *et al.*, 1995), la cual se ha demostrado origina de las células de la glándula coquiliaria. En el fluido uterino, donde la calcificación tiene lugar, parecen encontrarse determinados precursores de la matriz orgánica, los cuales pueden influir notablemente en la calcificación (Gautron y Nys, 1993).

En 1996, los mismos autores demostraron que la adición *in vitro* de extractos intraminerales de cáscara, modifica la morfología de la calcita. Este hallazgo clarifica el papel de la matriz orgánica en el control del crecimiento y la estructura cristalográfica de la cáscara de huevo. A continuación, procedemos a

describir de forma detallada la matriz orgánica en diferentes localizaciones dentro de la cáscara.

I.1.1. Membranas de la cáscara

Se trata de dos membranas, interna y externa, de diferente grosor (20µm y 60µm respectivamente) (Simons y Wiertz, 1965), adyacentes en toda su extensión salvo a nivel del polo achatado del huevo, donde se separan para formar la cámara de aire (Leach, 1982).

Estas membranas son permeables a los gases (Wangensteen *et al.*, 1970), y poseen importantes funciones: circunscriben el albumen, sirven de anclaje a la membrana corioalantoidea durante la embriogénesis (Dunn y Fitzharris, 1987), y actúan como barrera frente a la penetración de las bacterias. Para este último cometido, ambas membranas contienen lisozima (Vadehra *et al.*, 1972), mientras que la b-N-acetilglucosaminidasa, otra enzima antibacteriana, sólo se ha encontrado en la membrana externa (Winn y Ball, 1975).

Se originan en la región del istmo pero aún existen dudas sobre si son las células epiteliales, o las tubulares glandulares, las que secretan estas fibras (Johnson, 1999). Su peso y resistencia están sujetos a una variación individual importante, según se desprende de los estudios de Cooke y Balch (1970). Ambas difieren en su composición química, por ejemplo el ácido γ -Carboxiglutámico no se detecta en la membrana externa, y sí en la interna (Blake y Kling, 1984).

La pequeña cantidad de lípidos presentes en la cáscara se encuentra en las membranas, fundamentalmente fosfolípidos: lecitina, cefalina, esfingomieline y lisolecitina, pero también lípidos neutros como mono, di- y triglicéridos, además de colesterol y ésteres (Hasiak, 1970). Se han observado variaciones con la edad, y las membranas de huevos de gallinas viejas contienen menos lípidos que las de jóvenes (Hasiak, 1970).

Existe evidencia de la presencia de desmosina e isodesmosina en concentraciones cercanas al 0.1% (Starcher y King, 1980; Leach *et al.*, 1981;

Youtz *et al.*, 1984). Leach, en 1982, propuso una estructura hipotética para la proteína de las fibras en la que las cadenas de péptidos se entrecruzan mediante puentes disulfuro y derivados de lisina. Picard *et al.* en 1973, aislaron mediante digestión enzimática diferentes glicopéptidos, acompañados de residuos de serina y treonina.

Wong *et al.* (1984), demostraron que estas membranas en la gallina, contienen pequeñas cantidades de proteína similar al colágeno tipo I y V, constituyendo cerca de un 0.6% del total de la proteína de estas membranas. Hoy se conoce la existencia de moléculas colágeno tipo X que se hallan entrecruzadas. Mediante la administración de β -aminopropionitrilo, se ha podido demostrar que dichos cruzamientos juegan un papel importante en la estructura de las fibras (Arias *et al.*, 1997). Los mismos autores han confirmado la presencia de colágeno tipo I y V, así como pequeñas cantidades de dermatán sulfato, mediante técnicas de microanálisis de energía dispersa. Fernández *et al.* (1997), han detectado la presencia de colágeno tipo X, en los primeros estadios de formación de las membranas.

Ultraestructuralmente, las fibras de la membrana externa varían en diámetro entre 0.4 y 3.6 μm , mientras que las internas no exceden los 2 μm (Bellairs y Boyde, 1969) en la gallina. En su interior, éstas fibras constan de más de un cuerpo por fibra, rodeados de un espacio interfibrilar, esencialmente lípidos (Tullett, 1987), y una cubierta externa rica en carbohidratos (Wyburn *et al.*, 1973; Vadehra y Nath, 1973; Tranter y Board, 1982).

En la superficie interna de la membrana interna del huevo de gallina, se ha observado una membrana denominada limitante, cuya función sería retener el albumen al tiempo que posiblemente dirigir el crecimiento del corioalantoides durante el desarrollo embrionario (Bellairs y Boyde, 1969). Sin embargo, parece que esta capa pueda ser característica de los Galliformes (Becking, 1975). De igual modo, se ha descrito la existencia de una capa de cemento albuminoso, entre las fibras de la membrana interna (Brown *et al.*, 1965).

Tabla 1: Composición de la cutícula y las membranas testáceas en el huevo de gallina. Compilado de los datos procedentes de Vaehra y Nath (1973), Baker y Balch (1962), y Cooke y Balch (1970a).

Componente	% en Materia seca		
	Cutícula	Membranas de la cáscara	
		Mb Externa	Mb Interna
Ceniza	2.95	2.64	1.87
Nitrógeno	15.94		
Azufre	0.20-0.23	3.10	2.80-3.00
Fósforo	0.008-0.022	0.0025-0.0028	0.0028-0.0038
PROTEINAS			
Total	85-87	93-96	88-92
Soluble, 1% KCl	4.80-6.50	1.50-2.00	3.40-4.50
Soluble en agua	2.50-3.00	1.00-1.50	1.50-2.50
Insoluble	75-78	91-93	83-85
LÍPIDOS	2.50-3.50	3.50-4.20	1.90-2.70
CARBOHIDRATOS			
Total	5		
Glucosa	3.80-4.10	1.90-2.0	1.65-1.70
Hexosamina	3.60		
Galactosa	2.87		
Acido siálico	7.80-8.40	6.30-6.40	6.30-6.35
Acido urónico	0		
Ésteres sulfato	0		

Tabla 2: Grosor de las membranas testáceas en diferentes especies de aves.
(Romanof y Romanof, 1949).

Especies	Mb externa (mm)	Mb interna (mm)	Cociente E/I
Avestruz	0.12	0.08	1.5
Cisne	0.11	0.05	2.0
Pavo	0.09	0.01	5.3
Pollos			
Brahma	0.07	0.02	3.0
Leghorn	0.05	0.01	3.0
Bantam	0.04	0.01	4.0
Codorniz	0.06	0.00	7.5

La presencia de una estructura lamelar en la superficie externa de la membrana se ha observado en el pollo, el pato, la codorniz y el pavo. Existen también fibras transversales que unen ambas membranas, así como fibras que unen la membrana externa con la capa de los cuerpos mamilares (Bellairs y Boyde, 1969).

I.1.2. Protuberancias o cuerpos mamilares

La matriz orgánica presente a éste nivel puede dividirse en dos partes: los núcleos situados en el centro de las protuberancias mamilares, y la que forma parte de las mamilas como tales (Simkiss y Tyler, 1957). Los núcleos son proyecciones de la superficie de la membrana externa propuestas como lugares iniciales de la calcificación.

En la gallina pesan una media de 3.3 g por huevo, y se componen de carbohidratos incluyendo galactosamina (0.06%), glucosamina (0.86%), glucosa (0.24%), manosa (0.42%), fucosa (0.125) y galactosa (0.26%) (Salevsky y Leach,

1980). Los mismos autores han detallado la composición en aminoácidos de estos núcleos, encontrándose un total de diecinueve, entre los cuales cuantitativamente destacan cisteína, glutámico y lisina.

Los núcleos mamilares están aparentemente formados por interacciones covalentes y no covalentes, entre las fibras de la membrana de la cáscara y la matriz de los cuerpos mamilares (Robinson y King, 1968; Bellairs y Boyde, 1969). La naturaleza de la proteína de estos núcleos no se conoce, pero su estudio resulta de especial interés, ya que permiten la entrada de agentes capaces de producir la descalcificación durante la incubación del embrión.

Los estudios de microscopía electrónica muestran que la matriz orgánica, a nivel de los cuerpos mamilares, es una red de fibras de un espesor aproximado de $0.008\mu\text{m}$, en la gallina, con pequeñas vesículas adheridas. Esta matriz orgánica de los cuerpos mamilares, esta compuesta fundamentalmente por proteína. En 1992 Hincke *et al.*, mediante estudios cromatográficos, determinaron la existencia de una proteína de 81 Kda, y dos más pequeñas de 38 y 54 Kda ligantes de calcio, así como una cuarta insoluble de 129 Kda.

Los proteoglicanos y glucosaminoglicanos, juegan un papel fundamental en la matriz orgánica de la cáscara. Los estudios inmunohistoquímicos realizados por Arias *et al.* en 1992, revelan la presencia de cantidades pequeñas de dermatán sulfato en esta capa. Por el contrario, sí existen cantidades importantes de keratán sulfato como rasgo característico de esta capa. Mediante anticuerpos frente a moléculas de glucosaminoglicanos, se ha verificado que estos se encuentran distribuidos en la matriz calcificada de la cáscara, lo que sugiere que estén implicados en la deposición de materia mineral (Arias, 1992).

I.1.3. Matriz de la cáscara

Ultraestructuralmente se trata de una red de fibras gruesas de aproximadamente $0.01\mu\text{m}$ de diámetro y $10\mu\text{m}$ de longitud, organizadas paralelamente a la superficie de la cáscara (Simons y Wiertz, 1963). Como en

otras áreas de la matriz, ésta lleva asociada una serie de vesículas que en la gallina tienen un diámetro aproximado de 0.4 μm , y que aparentemente contienen aire (Becking, 1975). Su función no es bien conocida, si bien, pueden actuar como aislante, o bien influir en el intercambio gaseoso (Becking, 1975).

Químicamente consiste en una serie de capas de proteína y mucopolisacáridos, sobre la cual tiene lugar la cristalización para dar lugar a la capa de empalizada. Representa aproximadamente un 2% del total de la composición proteica de la cáscara, y es una estructura fundamentalmente proteica (70%). En ella se han identificado, no sólo proteínas fijadoras de calcio, sino también anhidrasa carbónica.

Contiene también carbohidratos (11%) (Baker y Balch, 1962), además de condroitin sulfato, xylosa, galactosa y ácido hialurónico (Cook y Balch, 1970; Robinson, 1976). Mediante gel de filtración y cromatografía de intercambio iónico se han separado más de un total de veinte proteínas y proteoglicanos (Krampitz y Engels, 1975; Heaney y Robinson, 1976).

I.1.4. Cutícula

Es una capa fina, de grosor variable a lo largo de su extensión, que cubre la superficie externa del huevo. Su espesor se ha cifrado entre 5 y 10 μm (Romanoff y Romanoff, 1949), si bien El-Boushy *et al.* (1968) han sugerido un espesor medio de 30 μm .

Ultraestructuralmente, en la gallina, puede describirse como una capa irregular, que contiene vesículas que contribuyen a su aspecto. En el interior de las vesículas más pequeñas hay gránulos que se cree puedan tener que ver con la pigmentación. Simons y Wiertz (1963), constataron que el número de vesículas disminuye con la edad del huevo, incrementando su tamaño y suavizando su superficie. La cutícula presenta además grietas radiales, algunas de ellas sobre los poros (Marshall y Cruickshank, 1938). Durante su formación se observan dos o

más capas, que posteriormente a la ovoposición son difíciles de discernir (Wyburn, 1973).

Los pigmentos están efectivamente confinados en esta capa (Kennedy y Vevers, 1976), y son fundamentalmente derivados pirrólicos no unidos covalentemente a la cáscara. Se han citado tres fundamentales: protoporfirina (produce color marrón), biliverdina IX α (da lugar a verdes y azules) y su quelato de zinc (Baird *et al.*, 1975). La mayoría de los huevos de color blanco contienen pequeñas cantidades de pigmentos (Kennedy y Vevers, 1973). Se ha sugerido que, estructuralmente, los pigmentos pueden conferir una cierta estabilidad por su efecto compactante de los cristales de calcita (Salomon, 1987)

En 1936 Moran y Hale, afirmaron que ésta capa estaba compuesta por células conteniendo mucina. Hoy se conoce que el 90% de ella es proteína, fundamentalmente insoluble, junto con un pequeño porcentaje de carbohidratos (glucosa, hexosamina, galactosa, ácido siálico o ácido urónico) y lípidos.

El peso de la cutícula en un huevo de gallina de 60 g es 12 mg (Parson, 1982). Su función se ha asociado a la capacidad para repeler el agua, y posiblemente, controlar la pérdida de vapor de agua en condiciones de extrema sequedad (Board y Halls, 1973). Aún existe controversia sobre su posible papel antimicrobiano. La eliminación de la cutícula mediante lavado aumenta la pérdida de agua del huevo durante la incubación, pero no parece tener efectos negativos en la tasa de eclosión (Peebles *et al.*, 1998).

I.1.5. Cubierta mucilaginosa

Los huevos de algunas especies de aves presentan esta capa adicional situada inmediatamente sobre las capas calcificadas (Smith, 1958; Board *et al.*, 1984). En algunas especies ocupa el lugar de la cutícula y puede estar mineralizada. Ultraestructuralmente se compone de nódulos que, según lo descrito por Tullet *et al.* (1976), están compuestos por vaterita, la forma de cristalización

más inestable del carbonato cálcico. Los mismos autores han sugerido que la función de esta capa puede ser la de evitar el bloqueo de los poros.

I.1.6. Diferencias interespecíficas y particularidades en las aves rapaces

En cuanto al diámetro de las fibras que componen las membranas de la cáscara. Becking en 1985, encontró diámetros similares en nueve especies distintas. El mismo autor en 1975, comparó el número de vesículas presentes en la matriz orgánica de la cáscara de diversas especies de aves. Los resultados indicaron que existen en mayor número en especies tropicales, lo que ha dado pie a pensar que se trata de una adaptación cuyo fin es facilitar el intercambio gaseoso. La composición en macromoléculas solubles de la matriz orgánica varía con las especies, e incluso con las razas (Krampitz y Engels, 1975; Heaney y Robinson, 1976).

La cutícula puede estar presente como en el huevo del pato, ser discontinua como en el caso de la gallina, o estar ausente como en la paloma (Board, 1974). Su grosor total varía con las especies (von Nathusius, 1868).

La variación en el contenido en pigmentos en las diferentes especies es ciertamente asombrosa. De un total de 108 especies estudiadas, correspondientes a 48 familias, Kennedy y Vevers (1973), encontraron que 49 especies contienen tan solo protoporfirina, 33 protoporfirina y biliverdina, 17 contienen los tres pigmentos, dos contienen biliverdina o protoporfirina más su quelato de zinc, y cinco carecen de los tres mencionados.

Existe gran variación en la presencia o ausencia de la cubierta de vaterita en los huevos de diferentes especies de aves. Por ejemplo, esta capa ha sido descrita en aves como el pelícano, mientras que no aparece en otras. Puede que su presencia responda a una adaptación para evitar la oclusión de poros, que puede producirse con facilidad en el ambiente en que los huevos de estas especies son incubados.

El grosor de las membranas de la cáscara varía con las especies. En general, aquellas especies con grosores importantes de la cáscara presentan membranas finas; mientras que cáscaras finas se acompañan de membranas muy gruesas, como sucede en el pavo o la codorniz.

I.2.CAPAS DE CRISTALIZACIÓN

La porción calcificada de la cáscara puede dividirse arbitrariamente en tres capas: mamilar, de empalizada y de cristalización superficial. Son responsables de la fortaleza mecánica de huevo y consisten, en un 97%, en materia inorgánica, fundamentalmente carbonato cálcico en forma de pequeños cristales de calcita (Board, 1982). Aunque el calcio es el catión predominante, también contiene cantidades significativas de magnesio.

Este se localiza fundamentalmente en la capa de los cuerpos mamilares, posiblemente debido a que juega un papel esencial en la síntesis de mucopolisacáridos.

I.2.1. Capa mamilar

Esta capa constituye un 20-35% del total del grosor de la cáscara y su contribución a la fortaleza global de la misma es fundamental. Constituye los pilares esenciales donde se inicia la cristalización y crecimiento de las capas posteriores. La cristalización radial, partiendo de los núcleos mamilares, da lugar a la formación de los cuerpos mamilares. De forma adicional, los cristales crecen desde el fondo de los núcleos mamilares de forma radial hacia el exterior, para penetrar la membrana testácea externa. Entre los lugares de contacto, quedan espacios que comunican entre sí formando toda una red aérea de canales, denominada sistema de ventilación intermamilar (Romanoff y Romanoff, 1949).

Su formación tiene lugar en la glándula coquilaria, durante las primeras cinco horas de la calcificación. El paso de agua hace que las fibras se encojan aumentando la distancia entre las fibras de la membrana. Los cristales, que crecen

de forma lateral, eventualmente contactan con otras mamilas, mientras que aquellos que crecen hacia el exterior pueden alcanzar la superficie de la cáscara. En determinadas localizaciones, los cristales no crecen totalmente unidos dando lugar a poros con un diámetro de 0.3 a 0.9 μm .

Tabla 3: Dimensiones de los cuerpos mamilares en diferentes especies de aves (Blasius, 1867; von Nathusius, 1874; y Burley y Vadehra, 1989).

Especie	Área de sección (mm²)
Pollo	0.0072-0.0163
Ansares	
Anser anser	0.021-0.024
Anser cinereus	0.023-0.025
Anser segetum	0.0145-0.015
Anser cygnoides	0.014
Cereopsis novae hollandiae	0.015
Palomas	
Columba livia domestica	0.011-0.014
Columba turtur	0.0072-0.0074
Columba palumbus	0.0083-0.0098
Columba oenas	0.011-0.012
Columba livia sera	0.013-0.014
Cuervos	
Corvus corone	0.0094-0.0103
Corvus cornix	0.00055-0.0071

Son estructuras sobre las cuales radica el comienzo de la cristalización de la cáscara. Su morfología, tamaño, distribución, y la presencia de anomalías contribuyen en cierta medida a la fortaleza final de la cáscara. Grandes espacios

entre los mismos pueden dar lugar a una excesiva debilidad. Lo mismo sucede cuando aparecen fisuras en su base. Por estas razones, son esenciales para el correcto desarrollo del embrión.

Las mamilas son estructuras estrechamente interrelacionadas con las membranas testáceas. El carácter de dicha unión, mediante la imbricación de fibras de la membrana externa en los lugares de nucleación provee de una fortaleza digna de reseñar.

I.2.2. Capa de empalizada o capa esponjiforme

Esta estructura se compone de pequeños cristales de carbonato cálcico en forma de calcita, de 20-30 μm de diámetro, en el huevo de la gallina (Perrott *et al.*, 1981). Los cristales se agrupan formando columnas romboédricas de calcita, directamente sobre los cuerpos mamilares, y perpendicularmente a la superficie (Silyn-Roberts y Sharp, 1986). Esta capa es la responsable fundamental de los patrones de difracción de rayos X, técnica mediante la cual se ha demostrado que se vuelve más densa conforme avanza hacia el exterior.

La capa de empalizada es densa, atravesada por numerosos canales microscópicos, distribuidos de forma irregular. La matriz orgánica no está uniformemente distribuida, siendo más abundante en la base.

I.2.3. Capa de cristalización externa

La estructura de esta capa es más densa que la capa de empalizada, y se sitúa perpendicular a la superficie de la cáscara. El grosor de esta varía entre 3 y 8 μm en la gallina (Burley y Vadehra, 1989).

I.2.4. Diferencias interespecíficas

El grosor total de la cáscara se ha utilizado como clasificación taxonómica (von Nathusius, 1871). Existen diferencias importantes entre las especies

altriciales y las precociales en el grosor de la cáscara. En las primeras el grosor es muy inferior a las segundas, por lo que el peso total de la cáscara es mucho menor.

Las localizaciones del calcio y el magnesio dentro de la matriz inorgánica parecen variar en función de las especies. En el pollo y otras galliformes el magnesio se concentra en dos lugares: la capa de los conos y la superficie de la cáscara. Sin embargo, en otros 19 órdenes de aves, este compuesto se localiza exclusivamente en la primera de estas localizaciones (Board y Love, 1980).

La capa de los cuerpos mamilares es prácticamente la única en especies con cáscaras muy finas como la golondrina (Romanoff y Romanoff, 1949). En el huevo de cada especie, la forma, el tamaño de las mamilas y su organización interior son características. El rango del área de estas mamilas es tan reducido para cada especie, que Nathusius (1874), describió que el área de una sección transversal de la mamila, puede servir para discernir entre especies similares.

Existen variaciones significativas en la orientación de los cristales de la capa de empalizada. Los cristales en el huevo de avestruces y emues están perfectamente orientados, mientras que esa orientación se ve perturbada en la gallina. En la mayoría de las especies la orientación es paralela a la superficie, mientras que en la gallina se encuentran mayoritariamente formando 45° (Silyn-Roberts y Sharp, 1985). En algunas especies, como las gaviotas o los pelícanos, la matriz no aparece en estrechas bandas longitudinales y transversales.

El tamaño y forma de los poros se ha utilizado para distinguir entre especies muy próximas, y sugerir la relación entre otras como avestruces y emues. Estas especies tienen un amplio rango de formas inusuales (Board, 1982), incluyendo poros bifurcados y poros con múltiples aperturas

II. FORMACIÓN DE LA CÁSCARA Y PROCESOS METABÓLICOS ASOCIADOS

II.1. FORMACIÓN DE LAS MEMBRANAS DE LA CÁSCARA

Las membranas se depositan sobre la superficie del albumen en el istmo. Hoffer (1971), y Draper *et al.* (1972), en la codorniz y el pollo respectivamente, han descrito que este proceso tiene lugar en el istmo glandular, durante cerca de 60 min.. Las células tubulares glandulares se encargan de la síntesis de la proteína, mientras que las células epiteliales no ciliadas son las responsables de la síntesis de los carbohidratos.

Las fibras parece se liberan debido a la presión que ejerce el huevo en su descenso (Solomon, 1975). La encima lysil oxidasa, precursora del aldehído de lisina responsable de la formación de enlaces cruzados desmosina-isodesmosina, se ha localizado en el istmo (Harris *et al.*, 1980).

II.2. CALCIFICACIÓN DE LA CÁSCARA Y SU REGULACIÓN

La calcificación comienza en la unión del istmo con la glándula coquilaria, o región tubular de la glándula de la cáscara. En la gallina, el huevo permanece aquí unos 15 a 30 min.. Los núcleos mamilares son los lugares iniciales de la calcificación. Fuji y Tamura (1970), y Stemberger *et al.* (1977), han demostrado que uno de los primeros signos de calcificación es la aparición de pequeños gránulos en la superficie externa de la capa externa. Estos gránulos contienen calcio, pero no carbonato, sino posiblemente citrato del que existe gran cantidad en el oviducto (Taylor y Hertelendy, 1960).

La mayor parte de la calcificación se produce en la glándula de la cáscara durante 20 horas. En primer lugar, los fluidos empapan el albumen y este crece hasta llegar al volumen normal en el huevo. Este fluido, se ha comprobado

mediante gel de electroforesis que contiene 7 a 9 bandas proteicas, además de anhidrasa carbónica, fosfatasa ácida y actividad esterasa (Salevsky y Leach, 1980). Gauton *et al.* (1997), han descrito dos glicoproteínas de 80 y 43 kDa en la fase inicial de la formación de la cáscara. Posteriormente, en la fase de formación rápida de la cáscara, aparecen cuatro proteínas de 180, 150, 116 y 32 kDa que coprecipitan con carbonato cálcico *in vitro*. En este estadio aparecen adicionalmente dos glicoproteínas de 36 y 20 kDa .

Contiene además sales de bicarbonato sódico, cloruro sódico, cloruro cálcico y cloruro potásico. Se trata pues de un reservorio de iones para la cáscara, a la que pasan a formar parte a una velocidad de deposición de 300 mg a la hora en la gallina (Bradfield, 1951).

El calcio proviene en parte de la comida (Hurwitz y Griminger, 1962), mientras que un 30% a 40% proviene de la esponjosa de los huesos que actúan como reservorio (Kyes y Potter, 1934; Müller *et al.*, 1969). El suministro de calcio depende también de su transporte, que se lleva a cabo ligado a proteínas, mientras que la porción en solución es reducida. La transferencia de este calcio desde la sangre hasta la cáscara ha sido revisada en profundidad por Eastin y Spaziani (1978). Sin embargo, existen aspectos aún desconocidos.

Lundholm en 1984, descubrió una fracción microsómica que contiene los gránulos secretores de calcio de la glándula coquiliaria en el pato. En 1985 Yamamoto *et al.*, determinaron que el calcio para la cáscara se transporta activamente en la glándula, transporte que depende de la actividad ATP asa. Las mitocondrias en esta glándula pueden jugar un papel fundamental como fuente de energía. En líneas genéticas de gallinas con cáscara fina, se ha detectado una actividad de esta enzima inferior a la de las gallinas con cáscara gruesa. Esto puede indicar que estas líneas genéticas varían en su capacidad de utilizar el calcio (Watanabe *et al.*, 1989).

El carbonato proviene de los iones bicarbonato de la sangre (Simkiss, 1967). La anhidrasa carbónica juega un papel fundamental en la calcificación,

proveyendo de iones carbonato en el lugar de la cristalización (Burley y Vadehra, 1989). La forma como los cristales de carbonato crecen y se orientan no es bien conocida, existiendo dos teorías que difieren en su esencia. La primera confiere a las proteínas de la matriz la virtud de dirigir e iniciar el crecimiento de los cristales (Silyn-Roberts y Sharp, 1986). La segunda propone un crecimiento por epitaxia, si bien da importancia a las proteínas de los conos mamilares.

Del mecanismo que controla el cese de la cristalización se conoce aún menos. Tullett *et al.*, en 1976, destacaron la importancia del fósforo en este proceso, basando sus aseveraciones en el hecho de que el fosfato interfiere en la cristalización y su concentración aumenta en la parte externa de la cáscara. Sin embargo, estudios posteriores por Board *et al.* (1984), parecen inclinarse hacia un control por parte de la matriz orgánica.

Las prostaglandinas pueden estar implicadas en el movimiento del calcio en la glándula de la cáscara. La progesterona estimula la síntesis de prostaglandinas PGf₂ alpha, PGE₂ y TXB₂ en homogeneizados de mucosa de la glándula. Lundholm en 1984, indagó en el papel de la progesterona, demostrando que no altera los niveles de calcio en la glándula.

Finalmente, la cutícula se forma también mientras el huevo se encuentra todavía en la glándula, apareciendo cuando el crecimiento del huevo tan solo se ha completado en un 50%, lo que hace sospechar que no interfiere en el paso de sustancias a la cáscara.

II.3. REGULACIÓN DEL METABOLISMO DEL CALCIO

II.3.1 Fuentes de calcio

El calcio para la formación de la cáscara proviene de la sangre, teniendo como fuentes primarias la absorción intestinal a nivel de duodeno y yeyuno, y la resorción ósea del hueso medular, pero también del cortical en caso de deficiencia. La importancia relativa de estas dos fuentes depende de la concentración del calcio

en la dieta. Sin embargo, cuando la formación del huevo no coincide con consumos de comida, como durante las fases de oscuridad, el hueso se convierte en la fuente primaria de calcio.

Mongin y Sauveur (1974), demostraron que el consumo voluntario de calcio por parte de la gallina aumenta durante la fase de formación del huevo. Existiendo la opción, el ave siempre elige aquella dieta que tiene un mayor contenido en calcio (Etches, 1987).

II.3.2. Regulación hormonal y renal del calcio

El calcio en sangre se encuentra en su mayoría ligado a proteína pero también en forma ionizada. El aumento de estrógenos durante las semanas anteriores a la puesta, hace aumentar el calcio sérico, vía el aumento de las proteínas a las que se liga: vitelogenina y albumina, pero no al aumento de la fracción difusible. La disminución de los niveles de estrógenos dan lugar a una disminución del grosor de la cáscara. Durante la ovoposición, las concentraciones de calcio ionizado se elevan, alcanzando máximos cuatro horas después de la ovoposición, para decrecer durante el periodo de la calcificación. Por el contrario, las concentraciones totales de calcio oscilan mínimamente durante el ciclo de puesta. (Johnson, 1999).

Siendo cierto el papel de los estrógenos en el ciclo de puesta y sus repercusiones, las investigaciones llevadas a cabo por Curl *et al.* (1985), ponen de manifiesto que las concentraciones de estrógenos y progesterona en plasma, durante las seis horas antes de la ovulación, no están altamente relacionadas con la calidad de la cáscara en la gallina. En relación con estos aspectos, las investigaciones llevadas a cabo por Soh y Koga (1994), demuestran que la progesterona produce un incremento en el acúmulo de pigmentos en la glándula, mientras que estrógenos y testosterona carecen de tal efecto.

La hormona paratiroidea ejerce un papel fundamental en la regulación del calcio, aumentando sus niveles durante el periodo de formación de la cáscara para

descender más tarde (Van de Verde, 1984). Sin embargo, se ha comprobando que esta hormona no regula los niveles de proteínas ligantes de calcio a nivel de la glándula durante la ovoposición (Nys *et al.*, 1986).

El riñón de las aves se adapta durante la puesta para proveer el calcio necesario para la formación de la cáscara. Estos cambios consisten en un aumento de la actividad adenilatociclasa, dependiente de la hormona paratiroidea, la elevación del número de receptores de ésta hormona y el incremento de la síntesis de vitamina D3. Hoy se conoce que los estrógenos regulan el sistema adenilatociclasa, dependiente de la hormona paratiroidea, además del número de receptores a nivel renal para dicha hormona (Elaroussi, 1993). La hormona paratiroidea actúa, estimulando la absorción de calcio y la excreción de fósforo en los túbulos renales.

Por otra parte, en el riñón el aumento preovulatorio en los niveles de estrógenos se traduce en un incremento de la actividad de la 1-hidroxilasa, lo que da lugar a un aumento en los niveles del metabolito de la vitamina D3, encargado de la regulación del metabolismo del calcio.

II.3.3. Metabolismo de la vitamina D

La vitamina D juega un papel importante en la regulación del metabolismo del calcio, vía el metabolito 1,25-(OH)₂ D3. La conversión a esta forma tiene lugar mediante la hidroxilación de la 25-hidroxivitamina D3 en el riñón, bajo control de la hormona paratiroidea y el estradiol (Soares, 1984). Cuatro horas antes de la ovulación, se produce un aumento de los niveles de éste metabolito en sangre, que persisten hasta 10 horas después de la ovulación (Castillo *et al.*, 1979). En 1985 Rambeck y Zucker, demostraron que los metabolitos 1, 25 y 24, 25 actúan de forma sinérgica en la cantidad de calcio excretada en la cáscara.

La resorción del calcio óseo esta regulada por la hormona paratiroidea, así como por la vitamina D3. Esta última también facilita la absorción de calcio a nivel intestinal. Se ha demostrado que los metabolitos de la vitamina D3 no

regulan ni los niveles de proteínas ligantes de calcio, ni el transporte de este ion en la glándula de la cáscara (Bar *et al.*, 1984).

II.3.4. Movilización del calcio óseo

El hueso medular se forma en la hembra durante los últimos 10 días antes de la ovoposición, bajo la influencia de los estrógenos y la testosterona. Los esteroides gonadales parecen actuar directamente sobre la médula, independientemente del consumo de calcio (Johnson, 1999). Durante la ovulación, se alternan periodos de intensa formación medular con periodos de depleción. Mediante radioisótopos, en 1985 Van de Velde *et al.*, demostraron que la cantidad de matriz de hueso medular aumenta de forma linear en la codorniz, entre las 4 y 22 horas después de la ovulación.

III. POROS E INTERCAMBIO GASEOSO

III.1. MORFOLOGÍA, ESTRUCTURA, DISTRIBUCIÓN Y FUNCIÓN DE LOS POROS

Son agujeros a través de la capa calcificada, aperturas de los canales que atraviesan la cáscara. Presentan diferente tamaño, de grandes a muy pequeños, y su distribución es irregular. Microscópicamente son irregulares y con forma de embudo. El sistema de poros lleva acabo la misión fundamental de permitir el paso de oxígeno, y la salida de CO₂ y vapor de agua. La forma del poro influye en la difusión gaseosa, fundamentalmente controlada por la porción más estrecha (Toien, 1987).

La cáscara de la gallina contiene de 7.000 a 17.000 poros, con un diámetro entre 15 y 65 μm en el exterior y 6 y 23 μm en el interior (Tyler, 1956; Simkiss y Taylor, 1971). Los poros no se hallan uniformemente distribuidos, lo que posiblemente contribuye a maximizar la fortaleza de la cáscara (Tyler, 1955). El

número de poros varía entre especies, así el pato posee un número más elevado que la gallina. El número de poros varía mucho, incluso dentro de la misma especie, sin embargo es ciertamente constante en el mismo individuo (Almquist y Holst, 1931; Romanoff, 1943). Black y Tyler (1944), encontraron que el primer huevo de la secuencia contiene un menor número de poros que los siguientes. Dentro de la superficie de un mismo huevo, los poros son más numerosos en el ecuador y en el polo achatado (Romanoff, 1949).

Los canales son únicos en la mayoría de las especies. Sin embargo, en algunas especies extintas como el moa (*Dinornis crasus*), o contemporáneas como el avestruz, estas estructuras son bifurcadas terminando en un grupo de poros dentro de la misma concavidad (von Nathasius, 1871). Esta característica de algunos huevos de especies altriciales, se ha asociado a una necesidad de ventilación adicional en relación con huevos grandes (Board, 1980).

Algunos de los poros son ciegos, pero la abrasión de la superficie durante la incubación hace que se destapen, incrementando la porosidad de la cáscara (Bryant y Sharp, 1934).

Tabla 4: Dimensiones máximas y mínimas de los poros en superficie de la cáscara de diferentes especies de aves. (Romanof y Romanof, 1949).

Especie	Rango de tamaño de poros	
	Poros máximo (mm)	Poros mínimo (mm)
Avestruz	0.05x0.05	0.02x0.02
Cisne	0.042x0.038	0.029x0.026
Pavo	0.055x0.037	0.037x0.031
Pato	0.036x0.031	0.014x0.012
Gallina	0.029x0.022	0.011x0.009
Faisan	0.014x0.012	0.013x0.010
Garceta	0.090x0.057	0.011x0.006
Gaviota	0.016x0.013	0.011x0.010

Los poros pueden estar parcialmente obstruidos por la cutícula y por estructuras especiales (Board, 1980), incluyendo esferas de materia orgánica o inorgánica. En la gallina están cubiertos por esferas de material proteináceo (Tyler y Geake, 1953).

Se ha demostrado que el número de poros se reduce en la misma especie a altitudes superiores (Rahn *et al.*, 1977; Packard *et al.*, 1977). La reducción es proporcional al descenso en la presión, y se baraja la posibilidad de que sean los cambios en la presión sanguínea los que actúen como señal modificadora (Carey, 1980).

III.2. CONDUCTANCIA Y VARIACIONES INTERESPECÍFICAS

Los poros son la única vía de comunicación para el intercambio de moléculas entre el embrión en desarrollo y el medio externo. Su número y radio efectivo incrementa con la masa del huevo (Ar y Rahn, 1985). El volumen total de gases intercambiados es grande. Por ejemplo, hasta el tiempo de la eclosión, un total de 20 litros pasan por la cáscara de un huevo de 80 g. Las reglas que gobiernan este intercambio se adecuan más a la primera ley de Fick que a la ley de Stefan. No obstante, Simkiss (1986), propone que la ley de Stefan es más adecuada en el caso de huevos con poros en clara forma de embudo.

La conductancia y el flujo son directamente proporcionales al número de poros. Esta relación sugiere que la conductancia de los poros en su individualidad es similar en las diferentes especies, así como la cantidad de oxígeno y vapor de agua que fluye por los mismos (Rahn *et al.*, 1987). Estos autores mostraron que, tras correlacionar el número de poros por huevo en un total de 161 especies con su masa, la tendencia fue similar (0.77), lo que sugiere que los flujos de oxígeno y vapor de agua son muy parecidos. En un momento preciso de la incubación, las propiedades de difusión de la cáscara deben excederse para proveer la

concentración adecuada de CO₂ en la cámara de aire (6%), lo que estimula la respiración pulmonar en el embrión (Windle *et al.*, 1938; Visschedijk, 1968).

Aunque el intercambio gaseoso del huevo con el exterior se realiza fundamentalmente por difusión, la naturaleza no equimolar de estos flujos da lugar a flujos adicionales por convección, que crean una sobrepresión en el interior del huevo (Paganelli y Rahn, 1987).

Los efectos sobre el intercambio gaseoso de dietas deficientes en calcio o la adición de acetazolamida han sido estudiados por Bebout y Hempleman (1994). Estos autores han indicado que la conductancia aumenta un 30% en las dietas deficientes en calcio y se acompaña de reducciones de hasta un 21% en el grosor de la cáscara. El número de poros no se ve afectado de forma significativa.

La acetazolamida aumenta un 200% la conductancia, ya que no sólo disminuye el grosor de la cáscara, sino que también aumenta el número de poros. Este ejemplo da una idea de la repercusión que los efectos de determinadas sustancias pueden tener en la cáscara, y por ende en el intercambio gaseoso necesario para el embrión.

La distribución de los poros en la cáscara varía con las especies. Un gran número de aves poseen una mayor densidad en el ecuador y el polo achatado, mientras que lo contrario sucede en otras especies (Tullett y Board, 1977).

Rahn *et al.* en 1987, comprobaron que al comparar el flujo de vapor de agua y la conductancia en 131 especies, con el número de poros en esas mismas especies, éstas dieron con un valor de conductancia de poro igual a 1.5 µg/ (d.torr)¹. Estos valores y la pérdida de vapor de agua se han determinado en varias especies, correspondientes a diferentes órdenes de aves incluyendo: Sphenisciformes, Procellariiformes, Pelicaniformes, Ciconiiformes, Galliformes, Anseriformes, Charadriiformes y Paseriformes (Rahn *et al.*, 1987).

Aquellas especies que tienen su hábitat a grandes altitudes han reducido su conductancia para adaptarse al medio. Este fenómeno se consigue mediante la

reducción en el número de poros, acompañada de un aumento en el grosor de la cáscara, tal y como se ha constatado en algunas aves andinas (Carey *et al.*, 1987).

IV. CÁSCARA Y DESARROLLO EMBRIONARIO

La cáscara y las membranas testáceas experimentan una serie de cambios químicos durante la embriogénesis. Estos cambios están relacionados con la difusión de gases y el aporte de calcio al embrión.

IV.1. OXÍGENO, DISPONIBILIDAD, CONSUMO Y DESARROLLO EMBRIONARIO

El aire y el vapor de agua entran y salen del huevo a través de los poros de la cáscara. Las membranas testáceas son impermeables al albumen, pero dejan pasar los gases. Durante la incubación, el embrión necesita un suministro de oxígeno que se ha cifrado en 30 ml/h en la gallina (Tullett y Deeming, 1982); al mismo tiempo, ha de liberarse del CO₂ sin perder excesiva humedad.

Los huevos de todas las especies pierden aproximadamente un $15 \pm 2.55\%$ del peso inicial durante la incubación, con independencia del tiempo de incubación, o el peso del huevo en cuestión (Rahn y Ar, 1980). Durante años se ha destacado la importancia de la porosidad de la cáscara, entendida como número de poros y espesor de la misma, en el correcto desarrollo del embrión. Pero, de acuerdo con Simkiss (1980), el papel de estas estructuras se ha sobredimensionado. El embrión es capaz de adaptarse a cambios importantes en el ambiente, por lo que se sospecha existen otros mecanismos por los cuales el embrión puede realizar estas adaptaciones.

Para satisfacer las necesidades crecientes de oxígeno, la membrana corioalantoidea actúa como un pulmón, gracias a la importante red de vasos que

soporta. Adicionalmente, la cáscara se hace más permeable al oxígeno por razones aún no muy claras (Burley y Vadhera, 1989).

IV.2. METABOLISMO Y REGULACIÓN DEL TRANSPORTE DE CALCIO

La mayoría del calcio necesario para el esqueleto del embrión deriva de la cáscara. En el pollo este porcentaje se ha cifrado en el 78 a 82% (Simkiss, 1961), mientras que en la codorniz se han referido valores de hasta el 84.2% (Ono y Wakasugi, 1984). El resto del calcio proviene del vitelo. La membrana corioalantoidea es la encargada de disolver y transportar el calcio durante la incubación. Esta membrana no contacta con la cáscara hasta el día 10 de incubación; es entonces cuando el calcio se transporta primeramente al vitelo y de allí al embrión. El mecanismo de solubilización del calcio no es bien conocido, si bien es posible que las células de la membrana se ayuden de la secreción de ácidos. Terepka *et al.* (1969), han propuesto que el transporte inicial se realiza por endocitosis, evitándose así los problemas de niveles elevados de calcio libre.

Los estudios realizados por Tuan (1987), demuestran que este transporte específico de calcio se realiza mediante el concurso de una proteína transportadora de calcio, la Ca^{2+} ATP asa y la anhidrasa carbónica al servicio de un mecanismo de endocitosis. Se apunta la posibilidad que la misma cáscara y sus membranas inicien el movimiento del calcio.

En 1984 Wakasugi, encontró que la cáscara contribuye también a proveer un 23.5% del total del magnesio que necesita el embrión. El mecanismo de absorción y transporte de magnesio parece ser distinto al del calcio, utilizando una proteína transportadora distinta.

V. FACTORES QUE INFLUYEN EN LA FORMACIÓN, ESTRUCTURA Y COMPOSICIÓN DE LA CÁSCARA

V.1 FISIOLÓGICOS Y DE MANEJO

El progresivo adelgazamiento de la cáscara con la edad ha sido descrito si bien no se conocen los factores exactos que contribuyen a este fenómeno, si bien se sabe que puede paliarse en cierta manera suplementando la dieta.

Tras la inducción de la muda, la captación de calcio por las células del duodeno aumenta mientras que el grosor de la cascara disminuye.

Harms (1990), comprobó que el peso de la cáscara y la gravidez específica en los huevos de gallina puestos durante la mañana es superior a los obtenidos durante el resto del día.

A lo largo de esta revisión hemos ido refiriendo el hecho de que existe un gran número de características de la cáscara que varían notablemente en función de la especie, pero algunas de ellas como el número de poros varían entre individuos de la misma especie siendo ciertamente constante para un mismo individuo. Del mismo modo el grosor total de la cáscara varía dentro de un rango pequeño (Romanoff y Romanoff, 1949).

El ayuno se utiliza de forma habitual en el manejo de las aves domésticas para inducir ciertos procesos como la muda. Koelkebeck *et al.* (1992), demostraron que periodos de ayuno de diez días o superiores pueden dar lugar a un incremento en la calidad de la cáscara.

Los estudios de El-Boushy *et al.* (1968), revelan que un ambiente húmedo y caluroso da lugar a un adelgazamiento de la cáscara, la cutícula degenera, las mamilas se redondean en su base y las columnas de calcita pierden su orientación habitual desarrollando cavidades. El estrés del calor excesivo da también lugar a una disminución en la producción de huevos y las características de la cáscara. Este fenómeno, no sólo se debe a la alteración del equilibrio ácido base y los

niveles de calcio, sino que además parece disminuir la capacidad de las células duodenales para el transporte de calcio lo que resulta un factor crítico en la disponibilidad de calcio (Mahmoud, 1996).

Los efectos del estrés sobre la gallina ponedora han sido revisados por Hughes *et al.* (1986). Aparentemente incluso los cambios más insignificantes en el ambiente dan lugar a anomalías. En función del momento en el que se produzca el estrés, las alteraciones varían. Si se produce durante los primeros estadios de formación da lugar a alteraciones en la forma del huevo mientras que en estadios avanzados se produce coloración rosácea o aspecto de cubierta de polvo, dependiendo del tiempo que hayan pasado retenidos.

V.2. GENÉTICOS Y DE DESARROLLO EMBRIONARIO

Se ha comprobado que variaciones mitocondriales pueden contribuir a variaciones fenotípicas en pollos como puede ser el grosor de la cáscara de huevo (Aggrey *et al.*, 1998).

En 1982 Hunton, concluye afirmando, que la variación en la calidad de la cáscara depende en un 58% de factores genéticos, siendo posible modificarla mediante cruzamientos.

Según avanza el proceso de incubación, el embrión va absorbiendo el calcio de la cáscara lo que se traduce en un adelgazamiento de la misma. El peso de la cáscara disminuye durante la incubación en aproximadamente un 5% en el pollo (Simkiss, 1967). Algunos estudios indican que este adelgazamiento se produce fundamentalmente en el último cuarto de la incubación (Vandersoep y Richards, 1970). Sin embargo algunos estudios en especies salvajes como el pelícano (*Pelecanus occidentalis*), o diversas especies de grullas indican que esta disminución no es significativa

V.3. NUTRICIONALES

V.3.1. Hipo e hipervitaminosis

Dosis elevadas de ácido ascórbico, entre 2.000 y 3.000 ppm, se han sugerido como capaces de mejorar notablemente el peso específico de los huevos, coincidiendo con un incremento en el nivel de calcio en sangre. Los estudios de Orban *et al.* (1993), indican que la vitamina C influencia el metabolismo del calcio en la gallina, favoreciendo la mineralización de la cáscara. Mas tarde en 1995 Zapata y Gernat, sugieren que niveles de vitamina C entre 250 y 500 ppm producen un incremento en el peso de la cáscara.

Posteriormente en 1996 Keshavarz, concluyo afirmando que el ácido ascórbico carece de efectos beneficiosos sobre la calidad de la cáscara o la mineralización ósea. Balnave *et al.* (1990), demuestran que la adición de ácido ascórbico no consigue impedir los efectos negativos de la inclusión de cloruro sódico en el agua de bebida. Del mismo modo, la vitamina C, a la dosis de 100 ppm, no alteró los efectos de la adición de 0.1% tiouracilo en la dieta (Peebles *et al.*, 1992).

El suplemento de la dieta en gallinas con 6.8 a 15 μg de $1\alpha\text{-OH-D}_3$, se ha comprobado que reduce el consumo de comida, la calidad de la cáscara y la producción de huevos. Sin embargo, dosis inferiores, o el uso de su precursor 25-OH-D₃ no produjeron efecto adverso alguno (Soares *et al.*, 1982). La supresión de la vitamina D₃ de la dieta de gallinas ponedoras dio lugar, tras dos semanas, a un descenso en los niveles de calcitriol y en el peso específico de los huevos. Doblando el aporte de vitamina D₃ en la dieta, no se produjo efecto alguno sobre los parámetros mencionados. La sustitución de la vitamina D₃ por el nivel óptimo de calcitriol mejoró el peso específico después de 21 semanas de tratamiento, sin elevar el nivel total de calcio o calcitriol en sangre (Tsang y Grunder, 1993).

Gallinas alimentadas con dietas deficientes en vitamina K, no dieron lugar a problemas reproductivos, no registrándose alteraciones en la calidad de la cáscara (Lavelle *et al.*, 1994).

La suplementación con niacina se ha estudiado en la gallina, con el objeto de intentar reducir el contenido en colesterol del huevo. Se ha constatado un aumento significativo de la incidencia de deformaciones en la cáscara (Leeson *et al.*, 1990), tras la administración de este compuesto.

V.3.2. Deficiencias y excesos minerales

Niveles bajos de calcio pueden afectar severamente la calidad de la cáscara (Graveland y Berends, 1997). Los mismos autores han demostrado que, la actividad en la búsqueda de calcio aumenta en passeriformes cuando se les priva de una fuente adecuada.

La disminución en los niveles de magnesio en la dieta, situándose entre 207 y 132 mg/kg, da lugar a una severa disminución de los niveles séricos de calcio y magnesio e induce una notable disminución del grosor de la cáscara (Waddell *et al.*, 1991). En estas condiciones, la cantidad de magnesio a nivel de la capa de empalizada disminuyó en comparación con los huevos control.

Deficiencias de manganeso en la dieta ocasionaron una disminución del grosor total de la cáscara y alteraciones en su ultraestructura con la aparición de cuerpos mamilares grandes e irregulares. El análisis químico de la matriz orgánica mostró una reducción de hexosamina y ácido hexurónico, relacionada con el papel predominante del manganeso en la síntesis de estos compuestos (Leach y Gross, 1982).

El aumento de calcio en la dieta, mediante suplemento en el agua de bebida, utilizando lactato de calcio, dio lugar a un aumento de la gravidez específica del huevo (Damron y Flunker, 1995).

Cierta controversia se ha planteado entorno al posible efecto de la adición de sal en el agua de bebida y sus efectos negativos, sobre la calidad de la cáscara

descritos por Balnave y Scott en 1986. Dichos efectos pueden revertirse mediante la adición de compuestos de zinc (Balnave y Zhang, 1993). Más tarde, se ha podido demostrar que el incremento de ClNa en el agua de bebida no da lugar a alteración alguna en la calidad de la cáscara, ni en la gravidez específica del huevo (Damron, 1998). Por el contrario, las dietas bajas en sodio, en combinación con la inducción de la muda, dan lugar a un incremento en el peso de la cáscara en gallinas (Berry y Brake, 1986)

La suplementación con iodo dio lugar a una reducción significativa del grosor de la cáscara acompañada de una disminución en el número de poros (Christiensen, 1990). Austic y Keshavarz (1986), demostraron que el aumento de cloro en la dieta produce una disminución en la fortaleza y grosor de la cáscara pero solo en niveles de calcio del 2% en dieta. Por el contrario, niveles superiores de calcio incrementan el grosor de la cáscara pero sólo en presencia de 0.86% de cloro en la dieta. Los resultados indican que la relación entre ambos minerales afecta a la calcificación de la cáscara, especialmente niveles de cloro excesivos en combinación con niveles limitantes de calcio.

Posteriormente en 1990 los estudios de Keshavarz y Austic, sugieren que los efectos negativos de la adición de fósforo y cloro en la dieta, pueden estar en parte relacionados con el aumento de la excreción de calcio. Este fenómeno puede estar relacionado con la acidosis como consecuencia de las manipulaciones en la dieta.

La inclusión en la dieta de aluminio silicato sódico en gallinas, dio lugar a un aumento en la calidad de la cáscara al igual que el suplemento con calcio. El aumento mencionado en primer lugar se produjo en verano, pero no en invierno (Kavous y McCormick, 1990).

El exceso de magnesio en la dieta provocó una disminución del peso de la cáscara en dietas bajas en fósforo, mientras que produjo el efecto contrario en dietas ricas en este elemento (Hess y Britton, 1997).

La suplementación en la dieta con bicarbonato sódico originó un aumento de la resistencia de la cáscara a la rotura. La mejora estuvo asociada a un aumento de la temperatura y el fotoperiodo, con el objeto de facilitar el consumo de alimento durante la formación del huevo (Balnave y Muheereza, 1997).

La deficiencia de cobre da lugar a huevos de tamaño mayor o menor de lo normal con cáscara distorsionada (Baumgartner *et al.*, 1978). Esta deficiencia da lugar a la ausencia de lisil oxidasa en el oviducto, lo que limita la capacidad de formación de entrecruzamientos en las fibras de la membrana haciéndolas más débiles, y aumentando la distancia entre núcleos mamilares que aparecen mayores. Los latirógenos, inhibidores de la lisiloxidasa, generan idénticas anomalías (Barnett *et al.*, 1957).

V.3.3. Lípidos y aminoácidos

La adición de 3% de ácido palmítico o ácido oleico, a la dieta en gallinas no produce alteraciones reseñables en la calidad de la cáscara.

Rabie *et al.* (1997), han demostrado que la adición de l-carnitina en la dieta mejora la calidad del albumen, sin producir efectos adversos en la cáscara. Del mismo modo, la suplementación con metionina tampoco produjo efectos negativos significativos en la mineralización de la cáscara (Wideman *et al.*, 1994).

V.3.4. Derivados de plantas y microorganismos

La inclusión de osteolatirógenos en la dieta de gallinas y concretamente semicarbacida hidroclicorada y β -aminopropionitrilo fumarato, dieron lugar a alteraciones en la ultraestructura de la cáscara. Dichos cambios consistieron en la disminución del grado de separación y ramificación de las fibras de las membranas testáceas, con el consiguiente cambio en la distribución de los lugares de nucleación. Este efecto se acompañó de una disminución del número de poros y una distribución irregular de los mismos.

La adhesión entre las membranas y la capa de los conos mamilares disminuyó, y se observó un aumento de los intersticios en la capa de empalizada, lo que disminuye la resistencia a la fractura (Chowdhury y Davis, 1995). Los resultados han sido confirmados recientemente (1998) por los mismos autores, afirmando que estos derivados producen aumento de la fragilidad de la cáscara.

La adición de alcaloides como escopolamina e hiosciamina, a dosis entre 75 y 150 mg/kg, no producen efectos negativos sobre el grosor de la cáscara. No obstante, a dosis más altas, se constataron reducciones en la producción de huevos (Kovatsis *et al.*, 1994).

La suplementación con fitasas derivadas de microorganismos se ha comprobado que aumenta la producción de huevos, permitiendo la reducción de los niveles de fosfato tricálcico en la dieta sin producir efectos adversos (Um y Paik, 1999).

La administración de 60 microgramos de LPSw (polisacarido derivado de la harina de centeno), por gallina y día, en el agua de bebida, produce un aumento significativo de la fortaleza de la cáscara y del número de huevos (Suzuki *et al.*, 1992).

V.4. AMBIENTALES

V.4.1. Temperatura y altitud

Temperaturas ambientales entre 15.6 y 23.3°C dieron lugar a un incremento del peso del huevo y su gravedad específica, comparado con los mismos parámetros en gallinas mantenidas a temperaturas superiores (Roland *et al.*, 1996).

Rahn *et al.* (1977), demostró que el número de poros se reduce en la misma especie a altitudes superiores. La reducción es proporcional al descenso en la presión, se baraja la posibilidad de que sean los cambios en la presión sanguínea los que actúen como señal modificadora (Carey, 1980).

V.4.2. Ecotoxicológicas

V.4.2.1. Organoclorados.

En muchos lugares del mundo desde 1940, se ha venido insistiendo sobre la alarmante disminución en el grosor de la cáscara de los huevos de algunas especies. Este adelgazamiento de la cáscara es el efecto subletal más conocido de los pesticidas organoclorados. Estos pesticidas también producen disminución de las tasas de eclosión y la supervivencia de los jóvenes dando lugar a fracaso reproductor (Cook, 1973). Rathcliffe (1967), Hickey y Anderson (1968), probaron la correlación entre la disminución del grosor de la cáscara y el DDT y otros organoclorados. La mayoría de los casos de disminución del grosor de la cáscara en poblaciones naturales de aves se ha demostrado se debe a los efectos del DDE. Ya en 1977 Kolaja y Hinton, sugieren que el DDT da lugar a la inhibición de la Ca-ATP asa.

El DDE actúa disminuyendo la salida del calcio de las células de la mucosa hacia la luz de la glándula de la cáscara. De esta manera, se altera la relación entre el calcio ligado, y las moléculas de ATP hidrolizadas durante el proceso de formación de la cáscara. El DDE es además un potente inhibidor de la calmodulina, que es un importante moderador de la respuesta de estas células a la progesterona y la síntesis de prostaglandinas (Lundholm, 1987). Este mismo autor demostró en 1994, que el DDE disminuía en un 24% la síntesis de prostaglandinas en la mucosa de la glándula de la cáscara.

La respuesta al tóxico difiere con las especies, siendo desde prácticamente nula en el pollo y otras galliformes, hasta extrema en aves como el pelícano (*Pelecanus occidentalis*). Las poblaciones de diversas especies de aves rapaces se han visto afectadas por éstos tóxicos, especialmente el halcón peregrino (*Falco peregrinus*), el gavián (*Accipiter nisus*) (Newton y Bogan 1978), el águila pescadora (*Pandion haliaetus*) (Wiemeyer *et al.*, 1988) y el águila calva (*Haliaeetus leucocephalus*) (Wiemeyer, 1984). La presencia de niveles elevados

de DDE se acompaña también de un aumento del número de poros de la cáscara y su porosidad en general, tal y como se ha visto en garzas (Burton, 1986).

Existen otros muchos organoclorados que actúan igualmente reduciendo el grosor de la cáscara. Schwarzbach *et al.* (1991), han demostrado que el Difocol, entre 1 a 10 mg/kg, durante 39 días, da lugar a una disminución del grosor de la cáscara similar a la producida por el DDE. Se almacena en los tejidos fundamentalmente en forma de dicofol, y el DDE no es uno de sus mayores metabolitos en el cernícalo americano (*Falco sparverius*). En relación con este tóxico se ha analizado la toxicidad de sus metabolitos en la paloma de cuello anillado (*Streptopelia risoria*), obteniendo la conclusión de que el principio activo posee más toxicidad que sus metabolitos en esta especie (Schwarzbach *et al.*, 1991).

La potencia de este producto se pone de manifiesto en los estudios de Bennett *et al.* (1990), sobre patos (*Anas platyrhynchos*) en los que tras el primer día de aplicación se produjeron disminuciones considerables del grosor de la cáscara similares a las producidas por el DDE.

V.4.2.2. PCBs

La contaminación global del ambiente por estos productos es causa de enorme preocupación. Su naturaleza lipofílica y su resistencia a la degradación han hecho que se encuentren distribuidos por todo el planeta. Se han descrito como agentes menos potentes en la modificación de las características de la cáscara en comparación con el DDE.

Lincer en 1972, describió la ausencia de efectos sobre la cáscara del Aroclor1254 en cernícalos americanos a la dosis de 10 µg/g en la dieta. El mismo autor encontró mayores reducciones en cernícalos que habían recibido 10 µg/g de Aroclor junto con 3 µg/g de DDE, que en aquellos que recibieron exclusivamente DDE. Lowe y Stendell en 1991, han referido que cernícalos americanos a los que

se adiciono 3 $\mu\text{g/g}$ de Aroclor en la dieta, de Enero a Julio, disminuyeron el grosor de la cáscara en un 5% con respecto a los controles.

V.4.2.3. Metales pesados.

Elevados niveles de zinc,, utilizados en la inducción de la muda, dan lugar a incrementos significativos en el peso de la cáscara (Berry y Brake, 1986).

Por el contrario, codornices mantenidas un año desde su nacimiento, con dietas conteniendo entre 2 y 32 ppm de cloruro de mercurio, no mostraron signo alguno de alteración en el grosor total de la cáscara (Hill y Shaffner, 1976). Sin embargo, una dosis oral de mercurio de entre 1 y 5 mg por ave y día, en gallinas, da lugar a un adelgazamiento de la cáscara.

Se ha comprobado que el calcio presente en la glándula no varía, si bien disminuye en un 33% la acepción de calcio dependiente de ATP en las células de la mucosa de la glándula (Lundholm, 1987). Esto puede deberse a una inhibición de la capacidad de absorción intestinal, o bien de la movilización del calcio medular (Lundholm, 1995). El mismo autor informa que los iones Hg^{2+} , Cd^{2+} y Al^{3+} , son agentes ecotoxicológicos, que causan disminución del grosor de la cáscara en las aves.

Los iones Cu^{2+} , Pb^{2+} , methyl- Hg^{+} , Zn^{2+} y Ni^{2+} , pueden actuar disminuyendo el proceso de captación de calcio dependiente de ATP. Una posible explicación de su efecto negativo, puede ser el que estos iones tengan afinidad por los lugares en que el calcio se liga al polipéptido calmodulina, y de este modo influyen en el metabolismo del calcio en la mucosa de la glándula coquiliaria (Lundholm y Mathson, 1986). En 1991 Lundholm, demuestra la capacidad de estos metales y en especial del mercurio para inhibir la unión de la progesterona a sus receptores en la mucosa de la glándula de la cáscara.

Cuando se incluyen pequeñas cantidades de calcio en la dieta se altera la composición de la matriz orgánica apareciendo una nueva proteína. Este efecto fue observado antes de que cualquier otro de los descritos apareciera, lo que hace

sospechar que la cáscara pueda ser utilizada como depósito para almacenar estos complejos, lo que la convertiría en un perfecto indicador del efecto de ciertos tóxicos (Burley y Vadehra, 1989).

Cernícalos americanos, alimentados con dietas entre 10 y 50 ppm de plomo desde Noviembre a Mayo, aunque acumularon plomo en cáscara de forma irregular, no presentaron anomalías en el grosor de la misma.

V.4.2.4. *Flúor.*

En 1983 Combs, refiere los efectos negativos de concentraciones de flúor entre 300 y 1200 ppm en gallinas. Estos consistieron en disminución del grosor de la cáscara, así como en su consiguiente resistencia a la rotura. Los niveles de flúor en hueso y cáscara de huevo, en gaviotas expuestas a emisiones, se correlacionan; si bien concentraciones en cáscara entre 92 y 180 ppm no dieron lugar a alteraciones morfológicas reseñables (Vikoren y Stuve, 1996). En el cárabo americano (*Otus asio*), la inclusión en la dieta de 200 ppm de flúor, dio lugar a una disminución en la tasa de eclosión, si bien no alteró el grosor de la cáscara (Patee *et al.*, 1988). En gallinas ponedoras, se ha determinado que la ingestión de 4.453 mg de flúor por día durante 74 semanas no produce efectos adversos (Coetzee, 1997).

V.4.2.5. *Biocidas.*

La inclusión de varias concentraciones de diflubenzurón, entre 2 y 250 ppm, en la dieta de gallinas ponedoras, no dio lugar a alteraciones en sus parámetros reproductivos, incluyendo el grosor de la cáscara.

Intoxicaciones subcrónicas por tri-n-butyltin óxido, producidas mediante la administración de 36 a 150 mg/ kg de dieta basal, dieron lugar a disminuciones en la tasa de eclosión en codornices. Estas dosis no produjeron alteraciones en el grosor y fragilidad de la cáscara (Coenen *et al.*, 1992).

V.4.2.6. Otros.

Existen otros tóxicos, que también se ha constatado producen disminución del espesor de la cáscara. Entre ellos se encuentra el hexaclorobenzeno, un pesticida industrial detectado en muchas especies de aves y que se ha visto disminuye la tasa de eclosión y supervivencia de las aves (Schwetz *et al.*, 1974), causando deformaciones en aves piscívoras (Gilbertson *et al.*, 1991).

Chakravarty y Lahiri (1986), demostraron que el lindano, a la dosis de 20mg/kg de peso, disminuye el grosor de la cáscara, causando alteraciones ultraestructurales. Las lesiones se caracterizan por la disminución del tamaño de las mamilas y también del espacio entre las mismas. También se ha apuntado inhibición de la formación de calcita, al tiempo que reducción importante en el número de poros. Los autores han sugerido la posibilidad de que el lindano de lugar a una deficiencia de estrógenos.

V.5. IATROGÉNICAS

En 1993 Chen *et al.*, evidenciaron que el descenso de los niveles de estrógenos, como consecuencia de la disminución de la actividad de determinadas oxidasas, da lugar a una caída en la tasa de puesta y el grosor de la cáscara.

La administración de histamina produce hiperfosfatemia e hipocalcemia, la cual es más relevante durante los estadios iniciales de la formación del huevo (Cabrera-Saadoun y Sauveur, 1986).

La administración de indometacina, droga que reduce significativamente los niveles de prostaglandinas, dio lugar a la inhibición de la formación de la cáscara. Este fenómeno se acompañó de un espectacular incremento en los niveles de calcio en la glándula de la cáscara, y una ligera disminución del calcio sérico (Lundholm, 1992).

La inhibición de la secreción de jugo gástrico mediante omeprazol disminuye el porcentaje de calcio soluble, siendo importante en la solubilización del carbonato cálcico. Sin embargo, no parece ser un factor determinante para la

absorción de calcio en el duodeno, y tiene una mínima influencia en el grosor de la cáscara (Guinotte *et al.*, 1995).

La administración de cimetidina a gallinas da lugar a una disminución apreciable de la calidad de la cáscara, por mecanismos distintos a la inhibición de la síntesis de la 250-HD3.

En 1969 Mueller *et al.*, describieron la acción inhibidora de la acetazolamida en la formación de la cáscara. Más tarde se ha comprobado que los diuréticos saluréticos como la acetazolamida, hidroclorotiazida, clortalidona, furosemida, ácido etacrínico y amilorida inhiben la formación de la cáscara, siendo la furosemida el más potente de ellos (Lundholm, 1990). En 1992 el mismo autor, demuestra que la furosemida inhibe la captación de 45Ca^{2+} por parte de la fracción subcelular de la mucosa de la glándula de la cáscara.

Niveles de tiouracilo del 0.05% en la dieta dieron lugar a un aumento de la conductancia relativa, con una mayor pérdida de agua en la gallina (Peebles *et al.*, 1994). Los cambios descritos se han atribuido a una disminución de los niveles de calcio, como consecuencia de un descenso en el consumo de comida.

V.7. INFECCIOSAS

La vacunación frente a la cepa F de *Mycoplasma gallisepticum* no produjo una disminución ni en el peso del huevo ni en la fortaleza de la cáscara (Branton y Deaton, 1985). Sin embargo vacunas vivas frente a reovirus se ha comprobado que disminuyen el grosor de la cáscara, la fertilidad y la tasa de eclosión en gallinas (Giambrone *et al.*, 1991).

VI. METODOS DE EVALUACIÓN DE LA CALIDAD DE LA CÁSCARA

La cáscara es ciertamente resistente alcanzando fuerzas de compresión y fuerzas tensiles ciertamente considerables (Rehkugler, 1963). La medida de la resistencia de la cáscara se ha asociado a la calidad de la misma (Hamilton *et al.*, 1979; Tullett, 1987). Son diversos los factores que contribuyen a la fortaleza de la cáscara, entre ellos figuran: el grosor total, el grosor de la capa de cristalización externa, la fortaleza de la adherencia a las membranas, la densidad de poros y su distribución, las propiedades de la matriz, la presencia de pigmentos, y la concentración de vesículas. Cada una de ellas es probable que se encuentre bajo regulación genética, pudiendo variar considerablemente.

VI.1. FÍSICOS Y QUÍMICOS

Se han desarrollado una serie de métodos físicos que evalúan: la resistencia a la compresión lateral y longitudinal, la deformación, el impacto y la punción (Hamilton *et al.*, 1979). Algunos de ellos han dado lugar a aplicaciones comerciales. En algunos casos, se ha utilizado análisis de la cantidad de calcio mediante rayos-X (Forberg y Odsjo, 1984).

La deformación de la cáscara es un parámetro distinto que ha recibido considerable interés (Hunt y Voisey, 1966; Tung *et al.*, 1968). Este último autor ha concluido afirmando que la rigidez de la cáscara es el parámetro más importante en la predicción de la fuerza de rotura.

La gravedad específica se ha venido utilizando regularmente como parámetro indicativo de la calidad de la cáscara (Harms, 1991). Entwistle *et al.* 1995, han utilizado fuerzas de compresión y anillos de neopreno para medir la diferencia de resistencia entre las partes interna y externa de la cáscara en huevos de gallina.

Bronsch y Diamantstein (1965), encontraron una correlación lineal entre la concentración de ácido urónico y la fortaleza de la cáscara. Esto implicaría la posible importancia de los mucopolisacáridos. Silyn-Roberts y Sharp (1986), han sugerido que la matriz orgánica influye actuando como un refuerzo fibrilar. En este sentido, la cantidad y distribución de esta materia tendría cierta importancia a considerar.

La presencia de pigmentos se ha comprobado que también contribuye a la fortaleza de la cáscara, como hemos citado anteriormente en esta revisión. Se ha descrito que durante el almacenamiento varía el contenido de agua en el huevo, y que este factor modifica la fortaleza del mismo. Las cáscaras con mayor contenido en agua aparecen con mayor fragilidad que aquellas secas. Esto puede estar relacionado con la rotura de los enlaces de hidrógeno intermoleculares en la matriz (Tyler y Geake, 1964).

Existen multitud de métodos químicos utilizados para conocer la composición mineral y orgánica de la cáscara del huevo incluyendo: espectroscopía de masas, microanálisis mediante sonda de electrones. No obstante, presentan ciertas limitaciones debido a su espectro puntual de determinación.

VI.2. MORFOLÓGICOS Y ULTRAESTRUCTURALES

En 1949 Romanoff y Romanoff, culminan sus estudios afirmando que el grosor total de la cáscara es, sólo en parte, responsable de su fortaleza. De acuerdo con lo anterior, Brooks y Hale (1955), concluyen indicando que tan solo el 58% de la variación en la fortaleza de la cáscara puede explicarse por variaciones en su grosor. Finalmente, Ar *et al.* (1979), en un estudio basado en cáscaras de 42 especies, encuentran que la fortaleza es proporcional al cuadrado del grosor.

Existe cierta controversia sobre el papel que la parte interna de la cáscara y en concreto la capa mamilar puede jugar en la fortaleza de la cáscara. Esto se debe a que, por una parte, esta capa esta menos mineralizada, pero por otra, es la

responsable del contacto con las membranas de la cáscara (Carter, 1971; Van Toledo *et al.*, 1982).

Recientemente, Carnarius (1996), ha estudiado la relación entre la ultraestructura y la fortaleza de la cáscara media en huevos con diferentes lesiones (rotura, abolladura o fuga). Los autores no encontraron diferencias significativas en el espesor de la capa mamilar y la de empalizada en los huevos con lesiones distintas. Sin embargo la resistencia a la punción fue significativamente mayor en los huevos simplemente abollados. De la misma manera, existe una correlación positiva entre el espesor de la capa de empalizada y el grosor total con la resistencia a la punción.

MATERIAL Y MÉTODOS

I. MATERIAL BIOLÓGICO

El águila perdicera (*Hieraaetus fasciatus*) es una especie escasa y de distribución irregular en el Mediterráneo. Cuenta con poblaciones relativamente numerosas en el sector más occidental, principalmente en España y Marruecos.

No existen censos periódicos de las poblaciones de águila perdicera en la región circunmediterránea. La revisión de la información bibliográfica existente muestra que en los últimos 30 años la especie ha experimentado un acusado descenso poblacional, quedando relegadas las poblaciones más importantes a la Península Ibérica y norte de África. Los datos relativos al número de parejas en este área de distribución figuran en la Tabla 5.

La población circunmediterránea del águila perdicera constituye uno de los núcleos principales de distribución de la especie en el mundo. En Europa, el águila perdicera cuenta con una población probablemente inferior a las 1.000 parejas y está considerada como una especie amenazada y en acusado declive.

La población española es sedentaria. Los adultos permanecen en sus territorios durante todo el año, y sólo las aves jóvenes e inmaduras muestran una tendencia viajera muy extendida entre las rapaces, divagando por la Península, y llegando algunas a África a través del Estrecho.

Su alimentación suele basarse en mamíferos, aves y grandes reptiles. Las presas suelen ser capturadas en el suelo, o cuando inician el despegue. Es desproporcionada la agilidad que muestra para su tamaño, lo que le permite capturar en vuelo aves tan diferentes en talla y costumbres como garzas, codornices, gaviotas, cogujadas, grajillas, etc.

Tabla 5: Número de parejas de águila perdicera de los países ribereños del Mediterráneo. * estimas.

España	675-751
Portugal	75-90
Francia	29-31
Italia	20-30
Ex-Yugoeslavia	8-10
Albania	0-2*
Grecia	35-45*
Chipre	10-15
Israel	20
Turquía	10-100*
Túnez	100*
Argelia	200*
Marruecos	500-1000*

La población española de águila perdicera está compuesta por 679-775 parejas, gran parte de las cuales se distribuyen por la mitad sur peninsular y la franja costera del Mediterráneo, lo que representa el 80% de los efectivos de la especie en toda Europa. Pero a pesar de su importancia se halla en proceso de regresión, por otro lado único entre las rapaces ibéricas.

En la década de los 80 la población disminuyó en un 15-20%, desapareciendo el 28% de las parejas, y su área de distribución se ha contraído y fragmentado. Ha desaparecido por completo en áreas del norte donde era muy escasa, tales como Asturias, Cantabria, Guipúzcoa, Segovia, y ha disminuido fuertemente (+20%) en otras zonas donde era común, como Navarra, Burgos, Guadalajara, Madrid y Toledo. La regresión también ha afectado a poblaciones con alta densidad como Cataluña,

Levante, Murcia, Albacete y Almería, con un continuo goteo de desaparición de parejas. La regresión ha sido de tal magnitud que en el período 86-90, el águila perdicera desapareció de 6 provincias. Las únicas poblaciones en las que no se ha detectado disminución se encuentran en Andalucía y el sur de Extremadura. La persecución, la competencia con el águila real y las alteraciones del hábitat, son las causas de la deserción del 26% de los territorios.

En el caso del águila perdicera, se considera la disminución de sus presas y la calidad de alimentación como una de las causas responsables de su regresión. Diversos autores han hecho especial hincapié en el estudio de la dieta, pero en ningún caso han reparado en los posibles sesgos ligados a la metodología utilizada: presas recientes presentes en el nido, restos recogidos después de la cría en el nido, egagrópilas con las presas aportadas por los adultos.

La extraordinaria abundancia de conejos en los ecosistemas mediterráneos explicaría en parte, el encontrar a tres de las grandes águilas de la Península: real, imperial y perdicera; pues podrían consumir la misma presa sin existir una fuerte competencia entre ellas. En este sentido, parece que los altos solapamientos de nicho no implicarían necesariamente competencia si la abundancia del recurso es superior a la demanda.

Un análisis comparativo de sus dietas muestra que, en el medio montano, el águila imperial ibérica y el águila real tienen un valor bajo de solapamiento trófico de sus dietas (49%), existiendo notables diferencias. El águila imperial ibérica consume significativamente más conejo y córvidos que el águila real; esta última captura mas especies del grupo "otros mamíferos" (*Carnívora* y *Rodentia*) (excepto *Oryctolagus*, *Lepus*, *Sus*, *Cervidae*) y galliformes (*Alectoris*).

En el medio no montano, lo más destacable es el alto grado de solapamiento trófico de las tres águilas, siendo del 71% entre el águila imperial ibérica y el águila real, del 80% entre el águila imperial ibérica y el águila perdicera y del 90% entre el águila real y águila perdicera. Todo ello parece estar motivado, fundamentalmente, por la alta frecuencia con que las tres águilas consumen *Oryctolagus*. Estos valores

de solapamiento trófico son mucho más altos que los encontrados entre otras aves de presa diurnas, aunque similares a los que presentan las rapaces nocturnas predadoras de microtinós.

Existe una tendencia a que estas parejas muestren un comportamiento trófico excluyente, o utilicen el territorio como una forma de disminuir la competencia, evitando, las parejas más cercanas, competir por las mismas presas, mientras que tienden a tener una dieta similar a las más lejanas.

Se desconoce el alcance que la neumonía hemorrágica vírica del conejo puede tener en la supervivencia de la población preadulta, ya que esta epidemia apareció simultáneamente a los primeros síntomas de desequilibrio demográfico del águila perdicera (1.988-89).

Pero el principal problema de conservación del águila perdicera, parece radicar en la elevada mortalidad que sufren los jóvenes e inmaduros. Primero en la etapa de emancipación, con un 45-59% de bajas, en algunas poblaciones se ha estimado hasta en un 83% con una duración del período de emancipación de 96 días. Segundo en las áreas de dispersión, en la que se producen el 35% de las muertes. La persecución y fundamentalmente la electrocución en los tendidos eléctricos causan un número de bajas difícilmente soportable. La muerte en los primeros 15 meses de vida oscila entre el 50-77%.

La información que se posee sobre el período de vida de las águilas comprendido entre el abandono del nido y la incorporación a un territorio de reproducción es escasa, y no permite establecer con certeza las tasas de mortalidad preadulta. Resultados de ejemplares con marcas alares arrojan cifras del 80-90%, siendo el disparo la causa de un 50% de las muertes, seguido por choque o electrocución en tendidos eléctricos que causan el 35% de las muertes.

Los modelos demográficos predicen que las poblaciones de águila perdicera son muy sensibles a las variaciones en los niveles de mortalidad adulta. Moderadamente sensibles a los cambios en la mortalidad preadulta y poco sensibles a alteraciones en la productividad. Por otro lado, el modelo demográfico permite

jugar con los parámetros demográficos y muestra que ni siquiera elevando el valor de la productividad hasta su valor máximo teórico en esta especie (2 pollos por pareja y año) se consigue invertir la tendencia regresiva de las poblaciones.

Es posible invertir dicha tendencia con ligeros cambios en las tasas de mortalidad adulta o preadulta. Los valores de supervivencia que serían necesarios son perfectamente realistas y compatibles con la biología de la especie, y se alcanzarían siempre y cuando se realizaran las medidas de gestión adecuadas (tendidos eléctricos y persecución directa).

II. PROBLEMÁTICA DETECTADA

Es muy diversa la problemática que afecta al águila perdicera en toda la Península Ibérica, no siendo el objeto del presente estudio la descripción pormenorizada de los mismos. Sin embargo, creemos importante comentar de forma resumida algunos de los factores de riesgo que actualmente afectan a la población, y su posible incidencia sobre los parámetros reproductivos de la especie de modo que los resultados del presente estudio puedan entenderse de forma global.

La problemática difiere dependiendo de la localización geográfica. Incluso dentro de áreas como Castilla - La Mancha los factores de riesgo varían notablemente. Así la población de águila perdicera asentada en la provincia de Guadalajara ha experimentado en las últimas décadas, una fuerte regresión, que ha incidido tanto en el número de parejas como en el patrón de distribución.

En el periodo comprendido entre 1980 y 1998 el tamaño de la población ha pasado de 24 a 13 parejas, lo que representa una disminución del 46% en 18 años. Consecuentemente, la distribución original de la especie se ha reducido considerablemente, constatándose la disolución de la gran mayoría de los núcleos

dispersos, así como la reducción y fragmentación de poblaciones como las del Sistema Central y del valle del río Tajo.

Además de esta tendencia regresiva, los estudios realizados desde 1995 han puesto de manifiesto la debilidad de los parámetros reproductores, circunstancia que puede sintetizarse indicando los valores medios de la productividad, que se reduce a 0,88 pollos/pareja ($n=34$). Esta devaluación del potencial reproductor de la especie se relaciona, indudablemente, con los problemas detectados en algo más del 40% de las parejas, problemas que les impiden resolver con éxito el compromiso de la reproducción. La negativa evolución de la población y la comprobación de que los niveles reproductores se mantienen por debajo de los considerados normales para la especie, son los principales elementos de diagnóstico sobre la situación del águila perdicera.

Además de la electrocución en tendidos eléctricos, la pérdida de hábitat, unida a las molestias en las áreas de nidificación como consecuencia de una excesiva presión humana, aparecen como algunos de los factores más importantes constatados hasta la fecha. La persecución directa, y los envenenamientos son causas de muerte habituales, constituyéndose en factores adicionales que contribuyen notablemente a la regresión que viene sufriendo esta especie.

En Cataluña y el sur de Portugal algunos de los parámetros reproductores como la tasa de vuelo experimentan reducciones en determinadas zonas muy concretas. Esto se debe a muertes juveniles asociadas con tricomoniasis, enfermedad producida por un protozoo ligada al consumo de paloma por ésta rapaz. La alteración del hábitat y las enfermedades han afectado presas antaño habituales para esta especie. Este factor ha hecho que el espectro trófico de algunas parejas se haya desplazado constituyéndose la paloma en la base de su dieta alcanzando en algunos casos hasta el 60% de la biomasa consumida, lo que eleva notablemente el riesgo de adquirir la enfermedad.

En áreas de la provincia de Ciudad Real se han detectado anomalías diversas en un número significativo de parejas que dan lugar a fracaso reproductor. Las observaciones apuntan al hecho de que un número de incubaciones no lleguen a buen término ya que los huevos se rompen durante las dos primeras semanas habitualmente. De forma adicional, ciertas parejas que antaño ponían de forma regular lo hacen ahora de forma intermitente, sin que se hayan visto alterados sus parámetros comportamentales, y en ausencia de molestias u otras alteraciones. El presente trabajo pretende ahondar en los posibles problemas reproductivos de la especie investigando sus causas.

III. ÁREAS GEOGRÁFICAS OBJETO DE ESTUDIO

El presente estudio se desarrolló en dos países: Portugal y España. Dentro de los mismos, las regiones escogidas fueron: El Algarve, Castilla - La Mancha y los Arribes del Duero. Las razones para su elección fueron diversas. En primer lugar, la ecología, parámetros reproductivos y problemática de estas poblaciones han sido y continúan siendo estudiada por algunos de los biólogos mas cualificados en el conocimiento esta especie, por lo que existía una base de datos y conocimientos fundamental sobre la que partir.

Las dos primeras poblaciones, presentan numerosas diferencias en factores como el hábitat, alimentación, factores de riesgo, latitud, altitud, usos del suelo, etc.. Estas diferencias darían una idea de cómo determinados factores pueden o no afectar a la ultraestructura de la cáscara. De forma adicional, se están realizando los estudios genéticos correspondientes sobre las dos poblaciones con fines comparativos. Ambas poblaciones cuentan con problemas distintos afectando a sus parámetros reproductivos. La población del Algarve portugués cuenta con tasas de puesta y eclosión ciertamente elevadas, centrándose su mayor problemática en la afección de pollos por tricomoniasis con tasas de mortalidad importantes. Por el contrario, la

presencia de esta patología en las poblaciones Castellano-Manchegas es anecdótica, centrándose la problemática en la reducción del número de parejas que llegan a poner, así como la tasa de eclosión. Otros factores como la reducción en el tamaño de la puesta no son bien conocidos, dada la dificultad para constatar determinados datos sin producir molestias.

La comparación entre estas dos poblaciones y la de los Arribes del Duero es de una importancia considerable ya que dicha población presenta similitudes y diferencias con ambas. La latitud y la climatología son factores diferenciales, pero también el ecosistema; las parejas del Algarve anidan en arboles mientras que el resto, salvo rara excepción, lo hacen en cantiles.

Para la compilación de la información requerida sobre las características geográficas y ecológicas de las parejas implicadas en este estudio se ha contado con fichas modelo de recogida de información poniendo especial énfasis en la compilación de los datos de fenología conocidos para las parejas implicadas en este estudio. Fichas de caracterización cubren los siguientes aspectos: localización geográfica, hábitat, uso y propiedad del suelo, datos de nidificación (altura, orientación, y número de nidos), grado de humanización y factores de riesgo.

Según estas fichas se han compilado los datos biológicos más relevantes de las subpoblaciones de donde las muestras proceden, de modo que puedan utilizarse en la discusión y elaboración de conclusiones.

IV. PERIODO DE ESTUDIO

La toma de muestras en el presente estudio se realizó durante las épocas de reproducción, y especialmente en los meses de Mayo y Junio correspondientes a los años 1997 a 1999 inclusive. El análisis de los datos se prolongó hasta el año 2000.

V. CRITERIOS DE SELECCIÓN Y PARÁMETROS REPRODUCTIVOS DE PAREJAS EXAMINADAS

Durante la toma de muestras se siguieron dos criterios de selección. En primer lugar, obtuvimos una representación lo más amplia posible de cada una de las tres poblaciones en las que se encontraran parejas geográficamente distanciadas, con diferentes niveles de éxito reproductor dentro de una misma zona.

Como segundo criterio se buscó la repetición del muestreo en años sucesivos, de modo que se tuvieran muestras correspondientes a la misma pareja durante varios años. Este último punto es de vital importancia para la detección del posible efecto acumulativo de ciertos tóxicos, al tiempo que se observa la posible variación individual.

Elaboramos dos protocolos de toma de datos generales: Ficha de antecedentes y situación actual de las parejas existentes y ficha de parámetros reproductores. La primera incluye: Datos históricos de los individuos integrantes, historial de éxito reproductor y cambios en el área de reproducción. En la segunda se reflejan los datos correspondientes a los años de estudio incluyendo: Proporción de parejas que ponen, éxito reproductor, tasa de vuelo y productividad. Para ello se han utilizado los siguientes parámetros:

1° Proporción de parejas que ponen: Resulta de dividir el número de parejas que ponen entre el número de parejas controladas.

2° Éxito reproductor: Resulta de dividir el número de parejas que sacan algún pollo entre el número de parejas que ponen.

3° Tasa de vuelo: Resulta de dividir el número de pollos que vuelan entre el número de parejas que se reproducen con éxito.

4° Productividad: Resulta de dividir el número de pollos que vuelan entre el número total de parejas controladas.

VI. TOMA DE MUESTRAS, TIPO, Y CLASIFICACIÓN

Para la toma de muestras contamos con la colaboración de escaladores profesionales. Las parejas fueron seguidas con detenimiento durante la estación reproductora, constatando los abandonos o en su momento la crianza de pollos. Los nidos no fueron abordados, hasta estar seguros de no ocasionar molestias. En muchos de los casos las muestras se recogieron durante el chequeo sanitario realizado a los pollos hacia los 42 días de edad con motivo de su marcaje para radioseguimiento. En contadas ocasiones las muestras fueron tomadas debajo del nido, ya que agentes meteorológicos provocaron la caída del nido, en el caso de aquellos situados en árbol.

Las muestras obtenidas en relación con el presente estudio fueron de tres tipos: 1) Huevos enteros intactos no eclosionados, transcurrido un tiempo más que prudencial a la finalización del periodo de incubación, 2) Restos de cáscara de huevos eclosionados, o no eclosionados y posteriormente dañados, o bien consumidos por algún predador.

En relación con los datos generales de cada resto de huevo, o cada huevo infértil hallado, se estableció un protocolo para la toma de datos entre los que se incluyeron:

- * Localización, pareja a la que pertenece.
- * Fecha de recolección, y posible orden en la puesta.
- * Tiempo de incubación, o abandono.
- * Examen ovoscópico: incluyendo apariencia, descripción etc..
- * Medidas externas.
- * Examen macroscópico: fértil-infértil y estado de conservación.
- * Examen microbiológico.
- * Estudios genéticos.

Tras los descensos a nidos efectuados, se procedió a su clasificación para lo cual se dio una clave a cada resto encontrado, clave a la que irán referidos todos los hallazgos, tanto macro- como microscópicos. Para la correcta clasificación de las muestras examinadas se cumplimentó una ficha en la que figuraron los siguientes aspectos:

1- Datos generales: Localización, núcleo, tipo de muestra, fecha, tiempo de incubación, tiempo abandonado y conservación.

2- Examen ovoscópico, posicionamiento del embrión, dimensiones de la cámara de aire y aspecto.

3- Medidas del huevo: Longitud, ancho, peso total, peso del contenido, peso de la cáscara.

4- Examen macroscópico: Incluyó la observación del aspecto de la cáscara, así como la toma de datos sobre el contenido, las medidas efectuadas se detallan en el apartado dedicado al estudio del embrión posteriormente en este capítulo.

5- Examen microbiológico: Se realizó cultivo en aerobiosis en agar sangre, XLD, y agar Sabouraud. En función de los aislamientos en placa se siguieron los protocolos de siembra en medios selectivos rutinarios en microbiología.

6- Examen toxicológico: Los métodos empleados se detallan en el apartado correspondiente.

VII. CARACTERÍSTICAS ULTRAESTRUCTURALES NORMALES, VALORES DE REFERENCIA Y CORRELACIÓN ENTRE MAGNITUDES

VII.1. TRATAMIENTO Y ANÁLISIS ULTRAESTRUCTURAL DE LA MUESTRA

VII. 1. 1. Localización y extracción

Los huevos enteros fueron transportados envueltos en papel de aluminio y refrigerados hasta el laboratorio. Una vez allí, los huevos fueron medidos (longitud y diámetro externo) y pesados mediante calibre y balanza digitales con errores de 0.01mm y 0.01g respectivamente. Las medidas macroscópicas efectuadas y su descripción figuran en la tabla general de medidas de esta sección.

Previo a la apertura se procedió a un examen ovoscópico en el que se investigó: La apariencia y posicionamiento del embrión, la forma de la cámara de aire, desperfectos o fisuras en la cáscara, etc.. La apertura se realizó mediante tijera en un plano longitudinal paralelo al eje longitudinal, con el objeto de visualizar el posicionamiento y tamaño relativo del embrión antes de su extracción. Una vez evacuado el contenido, el interior de la cáscara fue lavado con agua destilada, evacuada el agua y secado a temperatura ambiente (21°C) y humedad relativa del 35% durante 24 horas. Seguidamente se procedió a registrar el peso total de la cáscara.

Para el análisis ultraestructural de la cáscara se tomaron porciones no superiores a 5mm x 5mm procedentes del ecuador del huevo y obtenidas mediante fractura limpia por presión con pinzas de precisión.

Las membranas de la cáscara se obtuvieron de idénticas localizaciones, utilizando aquellos trozos que aparecen en la zona de fractura y separándolos seguidamente de la cáscara mediante pinzas.

Cuando la muestra consistió en restos de huevo se siguió el mismo procedimiento intentando obtener las muestras de las mismas regiones del huevo.

VII.1.2. Preparación para análisis por microscopía electrónica de barrido y registro gráfico

Para el análisis de las muestras se procedió a tomar trozos de una superficie aproximada de 9mm^2 , procedentes del ecuador mediante una cuchilla ultrafina. En el análisis de la sección transversal procedimos a la creación de una nueva fractura mediante presión tangencial, de modo que se evita dar como anomalías, posibles abrasiones ocurridas como resultado del tratamiento, almacenamiento, o agentes externos sobre la muestra.

Las muestras de cáscara fueron previamente hervidas con NaOH (2.5N) durante medio minuto. Las membranas no recibieron ningún tratamiento químico.

Las muestras de cáscara se volvieron a fracturar mediante presión contralateral con el objeto de crear nuevas fracturas para una correcta visualización de la sección transversal. Seguidamente procedimos a pegar tres trozos: superficie interna, superficie externa y corte sobre porta objetos cilíndricos de acero específicos para microscopía electrónica. Para la correcta visualización del corte, las muestra se situó en el plano sagital, es decir con la superficie perpendicular a la superficie del portaobjetos.

Como adhesivo se utilizó gel de metacrilato el cual se dejó secar parcialmente para evitar su absorción por la cáscara y la creación de artefactos.

Para el posicionamiento de las membranas utilizamos idénticas pautas. Especial cuidado hubo de prestarse a la colocación de cantidades mínimas de pegamento y al correcto secado del mismo dada la porosidad de las membranas.

Una vez adheridas, las muestras fueron metalizadas con oro al vacío utilizando un metalizador Sputter Coater Valvez SCD-004 por espacio de 30 min. La cubierta de oro obtenida fue de $50\text{ }\mu\text{m}$, mediante esta metalización se convierte

la muestra en conductora de modo que se evita que se cargue de electricidad estática y repela los electrones.

Las muestras fueron visualizadas con ayuda de un equipo de microscopía de barrido marca GEOL JSM 6400 equipado con un detector de electrones secundario. Se utilizaron aceleraciones de 20 KV. Tras un examen general a 60 aumentos de todas las superficies se tomaron anotaciones sobre características particulares generales de la muestra, pasando a un estudio pormenorizado de cada una de las capas realizando fotografías en papel 12 x 17cm a los aumentos que se indican en la siguiente relación, incorporando una escala de magnitudes:

Tabla 6: Listado de registros gráficos establecidos de forma sistemática para cada muestra estudiada mediante microscopía electrónica de barrido.

Vista	Aumentos
Superficie interna. Capa mamilar	150
Superficie externa. Cutícula	150
Sección transversal.	150
Detalle de la capa de empalizada.	1.000
Superficie externa de membrana testácea externa	1.000
Superficie interna de membrana testácea interna	1.000
Sección transversal de las membranas testáceas	1.000

Además de las imágenes que se han descrito, se tomaron muchas otras correspondiendo con estructuras anómalas, y detalles de especial relevancia entre las que figuran: detalles de la capa de cristalización externa y la orientación de los cristales, unión entre la membrana externa y la capa mamilar, particularidades de la estructura y morfología de los poros y canales, y detalles de la capa albugínea.

Aunque no se obtuvo registro fotográfico, si se tomaron anotaciones y datos cuantitativos en relación con los siguientes detalles ultraestructurales

A) Superficie externa:

- * Áreas de mayor densidad de poros (300X).
- * Áreas de menor densidad de poros (300X).
- * Detalle de la superficie externa (1.000X). Presencia de esferolitos, material amorfo, etc.

B) Superficie interna:

- * Zonas de mayor densidad de cuerpos mamilares (100X).
- * Zonas de menor densidad de cuerpos mamilares (100X).
- * Mamilas y poros (300X).

C) Corte transversal:

- * Perspectiva del corte (150X).
- * Detalle de la cutícula y capa de cristalización externa (1000X).

VII. 2 OBTENCIÓN DE MEDIDAS Y ANÁLISIS DE IMAGEN ASISTIDO POR ORDENADOR

Una vez positivadas las imágenes, estas fueron digitalizadas mediante escáner y archivadas en CD para su análisis mediante el sistema BIOCUANT de análisis de imagen. Este programa permite el tratamiento de imágenes, al tiempo que la medida de distancias lineales, áreas, densidades, etc. Mediante el sistema automático de medida se determinaron las siguientes que se detallan por capas, incluyendo una serie de medidas subjetivas resultado del estudio de las imágenes.

1. Cutícula

Cuantitativos

- *Número total de poros por unidad de superficie.*

Para el recuento total de poros procedimos a la magnificación del área total de la imagen mediante división de la misma en un total de 12 cuadrículas.

Contamos los poros visualizados con independencia de su tamaño, efectuamos el cálculo automático de su área mediante circunscripción de su perímetro (Figura F3a). Se examinó un área total de $5 \times 10^5 \mu\text{m}^2$.

- *Superficie total de poros por unidad de superficie.*

Calculamos de la misma forma descrita en el apartado anterior mediante suma automática de áreas.

- *Grosor de cutícula.*

Procedimos a la medida del grosor de la cutícula mediante el sistema de calibración y medida automática sobre imágenes digitalizadas.

Objetivos

Los siguientes aspectos se examinaron durante las sesiones de microscopía electrónica mediante examen de la superficie externa de la cutícula en fragmentos de una superficie aproximada de 2.5cm^2 . La constatación de la presencia o no de las siguientes estructuras se llevó a cabo a 150 aumentos.

- *Presencia de cutícula.*
- *Presencia de esferolitos y vesículas.*
- *Trazas de material en la entrada de los poros.*
- *Aparición de fracturas radiales.*
- *Aspecto de la cutícula.*

Se procedió a clasificar las muestras en dos tipos: de cutícula regular o irregular haciendo referencia a la rugosidad de esta capa examinada a 150 y 500 aumentos.

2. Capa de cristalización externa

Cuantitativos

- *Área.*

Para el cálculo del área de esta capa, se utilizó el mismo programa marcando como perímetro, el límite con la cutícula o restos de ella y como borde

inferior su límite con la capa de empalizada, siguiendo las irregularidades que aparecen en este trayecto (Figura F1).

- *Grosor.*

Dada la irregularidad de esta estructura, se midió su grosor en cada muestra en dos puntos representativos de máximo y mínimo grosor, para posteriormente hallar la media entre ambos valores. Los mismos puntos de referencia fueron utilizados para el cálculo del grosor de la capa de empalizada (Figura F1)

- *Número de estratos.*

Se realizó en la línea de máximo grosor de la capa de cristalización externa. El total de estratos incluyó el último como contacto con la capa de empalizada.

- *Número de canales.*

Se procedió al recuento del número de estos en una longitud de 800 μm medida sobre la línea de superficie externa de esta capa (Figura F2b).

Objetivos

- *Grado de cristalización.*

Se evaluó el número de estratos, el grado de definición de los mismos, la orientación de los cristales en los estratos, y por tanto la regularidad en el paralelismo de los mismos. Los grados de cristalización se establecieron de uno a tres: De deficiente a bueno.

3. Capa de empalizada

Cuantitativo

- *Área.*

Las medidas se realizaron con el mismo sistema, como en el caso de la capa de cristalización externa. El límite inferior se fijó en el borde superior de la capa mamilar, que se encuentra bien definido en las águilas, de modo que prácticamente describe una línea recta paralela a la superficie de la cáscara (Figura F1). La

superficie fue medida sobre la sección transversal de la cáscara de longitud igual a 600 μm utilizando una magnificación de 150 aumentos.

- *Área y número de vesículas.*

Dadas las importantes diferencias y grado de definición entre áreas distintas dentro de la empalizada, se calcularon de forma distinta para áreas de mayor y menor densidad registrando al mismo tiempo la superficie total de vesículas en cada tipo de área de forma separada (Figura F5, F5a y F5b). Las mediciones se hicieron sobre imágenes con una magnificación de 750 aumentos sobre la capa mamilar.

- *Ángulo de orientación de los cristales.*

El cálculo del ángulo de orientación se realizó de forma automática estableciéndose el eje perpendicular a la superficie de la cáscara (Figura F1).

- *Grosor.*

Se ejecutaron dos mediciones una máxima y otra mínima, definidas por la profundidad de la capa de cristalización externa, calculándose la media de ambas medidas. Las mediciones se realizaron de forma automática, sobre imágenes tomadas a 150 aumentos del corte de la cáscara (Figura F1).

Objetivos

- *Grado de cristalización.*

Para la clasificación del grado de cristalización se tuvieron en cuenta los siguientes aspectos: Definición y disposición de las columnas romboédricas, homogeneidad de los cristales, presencia de cristales amorfos, y continuidad con otras capas. La clasificación se estableció de uno (cristalización pobre o deficiente) a tres (buen grado de cristalización).

4. Capa mamilar

Cuantitativo

- *Grosor.*

Se procedió a la determinación del grosor expresado en μm mediante sistema automático de medida, previa calibración, tomando como referencia desde el límite con la capa de empalizada hasta el extremo de la mamila que contacta con la membrana externa (Figura F1). Se trabajó sobre imágenes digitalizadas y con una magnificación original de 150 aumentos.

- *Área mamilar al corte y área mamilar.*

El primero de estos parámetros se determinó sobre imágenes de la sección transversal de la cáscara, tomando como referencia los mismos límites mencionados para el grosor de esta capa. Las medidas se acometieron sobre una longitud de 800 μm medidos sobre la cáscara. El área mamilar se determinó mediante dibujo del perímetro de las mamilas ubicadas en un área total de $5 \times 10^5 \mu\text{m}^2$ y cálculo automático del área delimitada. Esta determinación se llevó a cabo sobre imágenes de la superficie de los conos mamilares, con una magnificación de 100 aumentos.

- *Área entre mamilas o del sistema de ventilación mamilar.*

Sobre las mismas imágenes utilizadas anteriormente y la misma área se procedió a delimitar el área entre mamilas y el cálculo automático de la misma (Figura F4).

- *Número y distancia entre conos.*

Sobre imágenes a 100 aumentos se organizó el conteo automático del número de estas estructuras en un área de $5 \times 10^5 \mu\text{m}^2$, al tiempo que procedió a su cartografía para la determinación de su área. Para la obtención de las distancias entre núcleos se eligieron tres núcleos al azar distribuidos por el área total, procediéndose a medir la distancia entre cada uno de ellos y los seis más próximos (Figura F4). Posteriormente se realizó el cálculo automático de la distancia media

- *Superficie de los núcleos mamilares.*

Se procedió a su cálculo siguiendo los mismos procedimientos empleados para el cálculo del área de las mamilas pero en este caso centrándose en circunscribir exclusivamente los núcleos de cristalización (Figura F4a).

Objetivos

- *Presencia de multinucleación.*

Para la determinación de este valor subjetivo examinamos fotografías tomadas a 100 y 150 aumentos, de cada una de las muestras. Hicimos anotaciones del grado de multinucleación en función del número de núcleos encontrados circunscritos dentro de la misma mamila (Figura F50).

- *Forma de las mamilas.*

Procedimos a la observación de la forma al corte de la mamila, estableciendo tres tipos distintos dentro de la generalidad. El primer tipo se denominaron mamilas planas, aquellas que presentan un relieve mínimo en su área de contacto con la membrana externa. Mamilas intermedias, en las que se aprecio una cierta elevación de la base a modo de meseta. Por ultimo, mamilas cónicas prominentes (Figuras F41 y F42). Estas observaciones se realizaron en imágenes con una magnificación de 150 aumentos.

- *Conexión con membranas testáceas.*

Esta evaluación la efectuamos a diversos aumentos: 150, 500 y 1000, tratando en primer lugar de visualizar de forma general la cantidad de membrana adherida a la superficie total de la mamila. Seguidamente analizamos la zona de unión como tal y la separación entre ambas estructuras, así como, la consistencia de la unión estudiada sobre cortes a 500 aumentos. Un parámetro importante también evaluado fue la cantidad de membrana que permaneció tras el tratamiento químico de la cáscara como índice de la fortaleza de la unión. En determinados casos, observamos la presencia de las formas mamilares a modo de sello en negativo, adheridas a la membrana externa de la cáscara (Figuras F39 y F39a) indicando una fuerte sujeción.

5. Cáscara

Cuantitativos

- *Grosor total.*

El grosor total de la cáscara se calculó siguiendo la misma metodología descrita anteriormente sobre imágenes con una magnificación de 150 aumentos (Figura F1).

6. Membranas testáceas

Cuantitativos

- *Grosor total.*

Se midió de forma automática sobre imágenes a 500 aumentos en las que se pudieron discernir los límites entre ambas membranas con facilidad (figura F6).

6. 1. Membrana externa.

Cuantitativo.

- *Número de fibras.*

Se trabajo sobre imágenes a mil aumentos en las que se trazó una línea de longitud igual a 100 μm y sobre la que se procedió a contar el número de fibras que cortan dicha línea (Figura F7). Aceptamos como cuantificación eficaz a la hora de evitar repeticiones que ocurren durante el conteo por área, ya que resulta difícil delimitar hasta dónde llega cada fibra, así como su identidad.

- *Diámetro de fibras.*

Se ejecutaron las mediciones sobre las mismas imágenes descritas anteriormente mediante el mismo sistema (Figura F7a). Se midieron un total de treinta fibras obteniéndose la media de las medidas realizadas. Las treinta fibras fueron las que cruzaron de forma consecutiva la línea trazada en el apartado anterior.

- *Grosor*

Se llevaron a efecto según las premisas establecidas para el grosor general de la suma de ambas membranas.

Objetivos

- *Distribución de fibras.*

Se observaron las fibras a 500 y 1000 aumentos, clasificando la distribución de las mismas en regular o irregular. Se consideró irregular cuando los espacios entre fibras variaron en tamaño y dentro de un área de $2.5 \times 10^5 \mu\text{m}^2$.

6. 2. Membrana interna

Cuantitativo.

- *Número de fibras, diámetro y grosor de la capa.*

Se realizaron siguiendo la misma metodología aplicada en el caso de la membrana externa (Figura F8).

Objetivo

- *Distribución de fibras.*

Se utilizó la misma clasificación descrita para la membrana externa (Figura F8).

Para la descripción de cada una de las estructuras se empleó la nomenclatura establecida por Tyler y Becking (1975).

VII. 3 ESTABLECIMIENTO DE VALORES DE REFERENCIA DE LA ESPECIE

VII. 3. 1. Criterios de selección.

Las parejas seleccionadas para establecer los valores de referencia cumplieron los siguientes criterios:

- Tasas de eclosión por encima de 1,65.

- Tamaño de puesta no inferior a dos.
- Edad de los consortes superior a 6 años.
- Factores de riesgo y estresantes mínimos.

Los huevos seleccionados han de cumplir los siguientes criterios:

- Fecha de puesta dentro de la fenología típica de la especie.
- Morfología externa normal, sin alteraciones en la forma, color o tamaño.
- Niveles de tóxicos no detectados o 100 veces inferiores a los referidos como tóxicos en la bibliografía.
- Huevos eclosionados y no eclosionados por causas naturales constatadas (caída del nido, posible infertilidad del macho, etc.).

VII. 3. 2. Establecimiento de valores de referencia

Una vez seleccionadas las muestras, se obtuvieron los valores de referencia expresados como medias y desviación estándar para aquellos parámetros clasificados como cuantitativos. Para el cálculo de magnitudes se utilizó el programa estadístico Statgraphicsplus. Además se incluyen descripciones de los parámetros objetivos y subjetivos relacionados con cada una de las estructuras de la cáscara, de modo que los aspectos estructurales queden definidos en su conjunto.

VII. 4. TENDENCIAS Y CORRELACIONES ENTRE MAGNITUDES

Se han descrito correlaciones entre diferentes parámetros en la cáscara de ciertas especies (von Nathusius, 1868). En un total de 34 especies distintas, el número de poros es directamente proporcional al número de cuerpos mamilares. En el presente estudio cada una de las variables: Cuantitativas, objetivas y subjetivas se ha correlacionado con el resto mediante los coeficientes de correlación de Spearman y Pearson, que permiten establecer el grado de

asociación entre dos variables. Se realizaron ambas pruebas al no conocerse las características gaussianas de la población analizada.

El grado de significación se estableció en $p < 0.05$. Los resultados se reflejaron pues como parejas de variables para las que el grado de correlación cumple los requisitos de significación. Mediante el test R cuadrado se examinó la idoneidad de cada uno de los modelos propuestos para cada relación entre variables.

Se realizó análisis de la varianza en la comparación entre variables cuantitativas y no cuantitativas, utilizándose ANOVA de una vía, estableciendo las variables cuantitativas como dependientes. El grado de confianza se estableció en el 95% y se realizó ANOVA de tabla que desliga la varianza en dos componentes: Entre grupos y dentro del mismo grupo. El grado de significación se obtuvo mediante el cálculo del valor p derivado del test - F.

De forma adicional se aplicó un test de rango múltiple al objeto de determinar que medias son significativamente distintas de que otras. Para discriminar entre medias se utilizó el procedimiento de la menor diferencia significativa de Fisher (LSD). Mediante este procedimiento existe un 5% de riesgo de asegurar que dos medias son distintas cuando en realidad son iguales. De forma adicional se practicaron los tests de Cochran, Bartlett, y Hartley para comprobar la hipótesis nula, que compara las desviaciones estándar de la variable dependiente para los diferentes valores de la variable independiente.

VIII. VARIACIÓN EN LOS PARÁMETROS ESTABLECIDOS EN FUNCIÓN DE FACTORES FISIOLÓGICOS, INDIVIDUALES, GEOGRÁFICOS Y CLIMATOLÓGICOS, GENÉTICOS E INMUNOLÓGICOS

Para efectuar este estudio se procedió en primer lugar a una selección de la información global sobre el área de estudio y los progenitores implicados que pudiera tener relevancia como factores implicados en variaciones individuales, geográficas, climatológicas, etc. de los parámetros de la cáscara. Los factores seleccionados figuran en la siguiente tabla.

Tabla 7: Factores de posible influencia sobre los parámetros ultraestructurales de la cáscara.

Fisiológicos

1. Edad de la hembra.
2. Estado nutricional de la pareja.
3. Grado de estrés de la pareja durante la época de puesta.

Geográficos

4. Núcleo poblacional.
5. Temperatura durante los días de puesta.
6. Altitud del área del nido.

Genéticos e individuales.

Infecciosos

7. Presencia de enfermedades infecciosas.
-

Estos factores se cuantificaron finalmente en una escala de 0 a 3, siguiendo los criterios que se exponen seguidamente. A cada pareja y para cada factor se le asignó de forma objetiva un valor en función de los estudios de biología y ecología, y conocimientos

En el caso de los niveles de tóxicos, los márgenes se fijaron en función de los descritos como peligrosos y causantes de alteraciones, y los niveles de detección de las técnicas empleadas.

Ante la dificultad de evaluar el estado inmunológico de los adultos, se compiló la información existente en cuanto a la presencia de enfermedades transmisibles en los pollos de estas parejas durante los años de estudio. Se intentó estudiar la posible relación entre la presencia de ciertas patologías en los pollos y su posible transmisión a partir de los adultos.

Tabla 8: Sistema de cuantificación de factores de posible influencia sobre aspectos ultraestructurales de la cáscara excluyendo compuestos tóxicos.

Factores de posible influencia	0	1	2	3
Edad de la hembra.	(3 a 6 años)	(7 a 15 años)	(16 a 25 años)	(mas de 25 años)
Grado de estrés de la pareja	Nulo	Mínimo	Medio	Máximo
Desarrollo embrionario	(1 a 10 días)	(11 a 20 días)	(21 a 30 días)	(31 a 39 días)
Abundancia de recursos tróficos.	Escasez	Aceptable	Bueno	Excelente
Temperatura ambiental máxima	<15	15-20	20-25	>25
Altitud del área del nido.	(0 a 300 m)	(300 a 600 m)	(600 a 1200 m)	(>1200 m)
Población		Algarve	Duero	Castilla - La Mancha
Organoclorados.	No detectados	Niveles descritos como lesivos		
PCBs.	No detectados.	Niveles descritos como lesivos		
Metales pesados.	No detectados.	Niveles descritos como lesivos		
Infecciosos	Ausentes	Alguna patología detectada		

IX. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE TÓXICOS AMBIENTALES EN CONTENIDOS DE HUEVO COMO BIOINDICADORES

IX. 1. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

Una vez examinados los embriones y completo su estudio morfológico y examen post-mortem (la metodología se describe en el apartado correspondiente), el contenido fue triturado en su totalidad y homogeneizado. Seguidamente se procedió a la determinación de la materia húmeda, la materia seca, y el porcentaje de humedad.

IX. 2. ANÁLISIS TOXICOLÓGICO

En la detección tanto de organoclorados como de PCBs se utilizó cromatografía de gases con detector de captura de electrones. Primeramente las muestras se homogeneizaron con 5 g de arena lavada en ácido, adicionando 5 g de sulfato de sodio anhidro. Seguidamente se añadieron 30 ml de una muestra de hexano y acetona 50:50. Una hora más tarde, el solvente fue transferido a un recipiente de 50 ml, y 10 ml de la mezcla exano-acetona se añadieron nuevamente para extraerse pasados 15 min. El proceso se repitió hasta completar los 50 ml del recipiente. Seguidamente, 25 ml de esta solución se transfirieron a un nuevo recipiente permitiendo su evaporación. Tras 24 h en un desecador se procedió a pesar y calcular el peso de la fracción lipídica.

La limpieza de la muestra se realizó utilizando una columna cromatográfica de alúmina. El extracto se transfirió a la columna y fue eludido con 5 ml de hexano. Se añadió un estándar a cada muestra, y una vez mezclado se transfirió a un vial cromatográfico para el análisis.

Para asegurar la rigurosidad y calidad del análisis se hicieron un blanco y un control positivo, utilizando huevo de gallina, para cada uno de los compuestos a analizar. Para cada una de las muestras se realizaron los análisis por triplicado.

Análisis mediante cromatografía de gases y captura de electrones.

Se procedió a la calibración del aparato previa a las determinaciones. Para este proceso se empleó diclobenil como standard interno. La identificación de los compuestos se llevó a cabo mediante comparación con su tiempo relativo de retención. Esta operación se realizó de forma automática.

Como cromatógrafo se utilizó el modelo Varían Model 8200, trabajando a una temperatura inicial de 60°C para finalizar a temperaturas de 170, 200, 280 y 320° C.

Los resultados del blanco se restaron del resultado final. Los congéneres de clorobifenil se han nombrado de acuerdo a la clasificación de Ballschmitter y Zell, incluyendo la lista propuesta por el International Council for Exploration of the Sea (ICES). Los límites de detección (LOD) se determinaron según la ecuación: $Y = Y_0 + 3S_{y/x}$, donde $y = LOD$, $Y_0 =$ es donde y intercepta la línea de regresión de calibración, y $S_{y/x}$ es el error estándar de la regresión.

En función del tóxico a determinar se siguieron tratamientos y sistemas analíticos específicos que describimos por grupos de tóxicos.

IX. 2. 1. Organoclorados

Se estudió la presencia de los siguientes compuestos organoclorados: HCB, α -HCH, γ -HCH, p,p-DDE, HEOD, p,p-TDE, y p,p-DDT. Para la determinación de los niveles de estos compuestos se empleó la técnica de espectrofotometría de absorción atómica.

Formas activas

- **Hexaclorobenceno (HCB)**

Se trata de un organoclorado utilizado con frecuencia como fungicida, si bien su presencia en el medio puede tener otros orígenes. Aparece como contaminante de otros herbicidas (BSI, ISO) y como producto de desecho en la síntesis de solventes clorados.

Las rapaces pueden verse afectadas por el consumo de presas que han ingerido semillas tratadas con este producto.

- **a-HCH y g-HCH**

Se trata de hexaclorociclohexanos, compuestos activos análogos del DDT, el segundo de los cuales es conocido como lindano ampliamente utilizado como insecticida en un pasado. Los isómeros a y b poseen sabor repulsivo para muchas especies de aves granívoras, por el contrario el lindano carece de olor y sabor lo que aumenta su probabilidad de ser ingerido.

El lindano es menos tóxico ya que se degrada mucho más rápidamente en el medio que otros organoclorados, siendo su vida media en tejidos y huevos inferior a la de otros organoclorados. Se ha comprobado que este último isómero se metaboliza a compuestos hidrosolubles lo que facilita su eliminación.

- **p,p-DDT**

Ha sido sin lugar a dudas el pesticida más usado, sobre el que no es necesario realizar comentarios sobre su peligrosidad. En la actualidad la evaluación de su peligrosidad viene dada en gran medida por la detección de los niveles de sus residuos: DDE y DDD fundamentalmente, a los cuales se hace referencia en el apartado metabolitos.

Metabolitos

- **Dieldrín (HEOD)**

Se trata de un producto de oxidación del Aldrín. Su estructura de epóxido le confiere una estabilidad extrema lo que le hace ciertamente peligroso. Se trata de productos extremadamente tóxicos para las aves si bien su toxicidad varía en

función de la especie. En el pasado dichos productos han dado lugar a grandes mortalidades en diferentes especies, si bien sus efectos sobre la reproducción también han sido documentados. Desafortunadamente no poseemos datos sobre niveles en huevos de águila perdicera.

- **p,p-TDE, y p,p-DDE**

Se trata de metabolitos del DDT, aunque existen numerosos compuestos, el DDE es el más lesivo estando directamente implicado en la disminución del grosor de la cáscara, al tiempo que limita el éxito reproductor. La respuesta a este metabolito varía dependiendo de la especie, así se ha comprobado que el grado de sensibilidad de diferentes especies de rapaces como el águila calva, el águila pescadora etc. varía. Los niveles de detección para los compuestos tóxicos analizados se exponen en la tabla 9.

Tabla 9: Niveles de detección para los diferentes compuestos para el total del extracto.

ORGANOCOLORADO	LOD(ng)
HCB	0,42
a- HCH	0,67
g- HCH	0,48
P,pDDE	0,46
HEOD	0,45
P, pTDE	0,53
P,p-DDT	90

IX. 2. 2. Estudio de los niveles de bifenilos policlorados

Los PCBs son una familia compuesta por un total de 209 congéneres con similar estructura. Cada uno de ellos posee una lipofilia, toxicidad, y metabolismo distinto, de ahí la necesidad de un análisis pormenorizado. Su toxicidad aguda es ciertamente rara a excepción de accidentes. Sin embargo su verdadero riesgo

reside en sus efectos sobre el sistema inmune, la reproducción y el comportamiento.

Para su determinación se han seguido las mismas pautas que para los organoclorados. Procederemos en este estudio a detallar los niveles analizados de los PCBs más interesantes desde el punto de vista toxicológico en ecosistemas terrestres. Los resultados se han expresado en ug/g de materia seca, húmeda y contenido lipídico. De este modo es posible comparar con los datos emanados de otras publicaciones.

Se han analizado un total de 25 congéneres distintos cuyos números figuran en las tablas correspondientes.

IX. 2. 3. Estudio de los niveles de metales pesados

Dadas las limitaciones y el hecho de que, tan solo en el caso del mercurio se han constatado efectos significativos sobre la estructura de la cáscara en aves salvajes, se decidió restringir la búsqueda a este compuesto. De forma adicional existía un especial interés por medir los niveles de mercurio ya que una de las zonas de estudio, Almadén, posee antecedentes históricos relevantes en la minería de este metal en nuestro país. Desde hace tiempo se viene especulando con la posibilidad de que este metal pudiera estar implicado en los problemas reproductivos del águila perdicera en esta zona.

Dado lo intrigante de los numerosos efectos distintos que puede producir este metal, es especialmente interesante su determinación, ya que de encontrarse niveles elevados se podría indagar sobre los niveles en presas consumidas por estas aves.

Existen otros metales que pueden producir problemas, si bien se trata de daños sobre otros órganos. El plomo es quizá el más significativo; sin embargo sus efectos sobre la cáscara del huevo, aunque se han citado, no han llegado a demostrarse experimentalmente, por lo que hemos creído conveniente no abordarlo en este momento.

La detección de los niveles de mercurio se realizó mediante espectrofotometría de absorción atómica de vapor frío en el caso del análisis del contenido de los huevos. Un gramo de muestra fue desecado durante 12 horas a 80°C para determinar la humedad de la muestra. Seguidamente se añadió ácido nítrico para realizar una digestión en frío de la muestra durante 12 horas. Las muestras se calentaron hasta 120 °C durante 30 a 60 minutos. Posteriormente se añadió 1 ml de peróxido de hidrógeno para completar la digestión de la muestra.

Las determinaciones se realizaron utilizando un espectrofotómetro de absorción atómica: Solar 969.

El límite de detección de esta técnica se fijó en 20 ng y fue calculado siguiendo los mismos procedimientos descritos para los compuestos organoclorados y PCBs.

Para el análisis de la posible presencia de mercurio en las cáscaras de huevo se empleó microscopía electrónica de barrido acoplado a microanálisis de energía dispersiva de rayos X (SEM-EDX). Esta última técnica es aleatoria en el caso de los metales ya que depende en gran medida de la fortuna en el punto de incidencia no pudiendo calificarse de significativa. No obstante se decidió realizar una serie de pruebas estipuladas. Los límites de detección para esta prueba fueron de 0,5 ug/g.

IX. 3. ANALISIS ESTADÍSTICO

Para el establecimiento de la existencia de diferencias significativas entre poblaciones en las variables examinadas en el presente estudio se utilizó ANOVA multifactorial estableciéndose un intervalo de confianza del 95%. Las poblaciones se nominaron como 1, 2 y 3, y se analizaron todos los parámetros cuantitativos obtenidos durante el examen ultraestructural de la cáscara y membranas testáceas en esta especie.

X. DOCUMENTACIÓN DE ESTADÍOS EMBRIONARIOS Y RELACIÓN CON PARÁMETROS ULTRAESTRUCTURALES

X. 1. CRITERIOS DE SELECCIÓN DE EMBRIONES

Para la selección de embriones se siguieron los mismos criterios establecidos para los huevos y descritos con anterioridad. De forma adicional, se descartaron aquellos embriones que presentaron anomalías debidas a posibles problemas infecciosos, tóxicos, de incubación, genéticos, etc. incluyendo los agrupados en la siguiente tabla:

Tabla 10: Criterios adicionales de exclusión de embriones para valores de referencia:

-
- Asimetría o desproporción del cuerpo o las extremidades.
 - Petéquias, equimosis, serositis u otros signos de procesos infecciosos.
 - Malposición.
 - Fallecidos durante la eclosión.
-

X. 2. TOMA DE MEDIDAS Y OBTENCIÓN DE VALORES DE REFERENCIA CLASIFICACIÓN DE ESTADÍOS EMBRIONARIOS

Una vez abiertos los huevos se procedió al examen post-mortem de los embriones. Durante dicho examen se utilizó la siguiente ficha para la recogida de datos:

Tabla 11: Examen post-mortem de embriones. Datos generales.

Pareja:

Localización:

Fecha de recolección:

Fecha de examen:

Tiempo de incubación:

Tiempo de abandono:

Conservación:

Tiempo de refrigeración:

Una vez obtenidas las medidas, los resultados se presentaron como medias más menos desviación standard. Los cálculos estadísticos se realizaron mediante el programa mencionado con anterioridad.

Para la descripción de los diferentes estadios embrionarios encontrados se han utilizado de forma paralela dos clasificaciones distintas. La primera es la descrita por Hamilton en 1952, y que se considera la clasificación de referencia para las aves. Esta clasificación se basa en características morfológicas externas.

De forma adicional hemos adjuntado los estadios correspondientes en la adaptación de la clasificación de Carnegie para embriones de mamífero realizada por Buter y Juurlink para el embrión de pollo en 1987. En esta ultima clasificación se detallan características internas del embrión obtenidas de los estudios detallados llevados a cabo por Romanoff (1969), Hamilton (1962), y Freeman y Vince (1972). Los estadios mas avanzados del desarrollo embrionario no se han referenciado debido a la dificultad y falta de datos al respecto. Por lo tanto, se ha citado exclusivamente los días de incubación y las características morfológicas más relevantes.

Tabla 12: Examen macroscópico de embriones, medidas básicas.

Embrión (medidas en mm):

- Longitud :
- Grosor:
- Antebrazo:
- Tarso:
- Base a punta de pico:
- Ojo:
- Peso:
- Edad:
- Hallazgos patológicos:

Anejos embrionarios (peso en g)

- Amnios:
- Alantoides:
- Saco vitelino:

Examen microbiológico:**Examen histopatológico:**

X. 3. RELACIÓN CON PARÁMETROS ULTRA-ESTRUCTURALES Y ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

En aquellos casos en los que se encontraron anomalías afectando a la cáscara, se establecieron correlaciones entre estos parámetros y la presencia de anomalías afectando al desarrollo embrionario. Mediante análisis multivariable se estudiaron estas correlaciones en función de los valores de referencia establecidos para embriones. Se procedió al análisis de la varianza mediante ANOVA multifactorial, estableciéndose como variables dependientes todas aquellos parámetros cuantitativos de la cáscara. El grado de confianza adoptado fue del 95%.

RESULTADOS

I. DESCRIPCIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS Y ULTRAESTRUCTURALES NORMALES DE LA CÁSCARA, ESTABLECIMIENTO DE VALORES DE REFERENCIA Y CORRELACIÓN ENTRE MAGNITUDES

I. 1. CARACTERÍSTICAS DE LA MUESTRA OBTENIDA

Se obtuvieron un total de 52 muestras, de las cuales 17 concernientes a 1997, 22 a 1998 y el resto a 1999. Del total de muestras, 28 correspondieron a la población del Algarve en Portugal, 15 a la población de Castilla - La Mancha en España y el resto a la población de los Arribes del Duero en Portugal.

Del total de muestras obtenidas, 25 fueron huevos enteros, tanto infértiles como conteniendo embriones de diferentes edades. El resto de muestras consistieron en restos de cáscara sin contenido. De los huevos intactos, 16 de ellos fueron fértiles, mientras que en el resto no se detectó la presencia de embrión. De los residuos de cáscara obtenidos, al menos ocho pertenecieron a huevos eclosionados.

Tabla 13: Características de la muestra obtenida.

HUEVOS INTACTOS		RESTOS DE CÁSCARA	
Fértiles:	16	Eclosionados:	8
Infértiles:	9	No eclosionados:	7
Total:	25	Desconocido:	13
		Total:	27

Las muestras obtenidas fueron estudiadas mediante microscopía electrónica de barrido, estableciéndose un registro fotográfico consistente en un total de 432 imágenes. Los datos se resumen en la Tabla 13.

I. 2 ESTABLECIMIENTO DE VALORES DE REFERENCIA DE LA ESPECIE PARA LAS MAGNITUDES DESCRITAS

I. 2. 1 Tamaño de la muestra seleccionada

Siguiendo los criterios descritos en el apartado: Material y métodos, se seleccionaron aquellas parejas que cumplieron con los requisitos exigidos. Dado que el estudio contempla muestras procedentes de tres poblaciones separadas geográficamente, se procedió a establecer los valores de referencia para cada población en concreto, lo que permitirá comparar a posteriori diferentes parámetros en las distintas poblaciones.

I. 2. 1 Establecimiento de valores de referencia

Del total de muestras se seleccionaron cuatro parejas correspondientes a la población de El Algarve, y tres por cada una de las poblaciones restantes.

El estudio incluyó valores cuantitativos, descripciones objetivas y las valoraciones subjetivas sobre aspectos relativos a la ultraestructura de determinadas capas de la cáscara.

Procedemos a establecer los valores de referencia de forma separada para cada grupo de muestras correspondientes a poblaciones distintas y para cada uno de los parámetros estructurales de la cáscara. Trataremos en este apartado las diferencias entre valores de referencia cuantitativos en poblaciones distintas y su significación estadística. Las diferencias en cuanto a los aspectos objetivos y la presencia de estructuras anormales se analiza en detalle en el apartado: Poblaciones, del capítulo dedicado a diferencias geográficas.

1. Cutícula

Cuantitativos

- *Número total de poros por unidad de superficie.*

Los resultados en cuanto a número de poros se muestran en la Tabla 14. Los datos se expresan en número de poros por $5 \times 10^5 \mu\text{m}^2$

Tabla 14: Características generales en relación con los poros de la cáscara del águila perdicera en las diferentes poblaciones.

Población		CARACTERISTICAS GENERALES			Área media (μm^2)
		Grosor total (μm)	Área porosa (μm^2)	Nº de poros	
	Media	410.7	12624.8	485.4	26.0
Algarve	SD	± 27.8	± 10711.8	± 273.3	± 3.92
(n=21)	Mínimo	375.4	870.0	45.0	19.3
	Máximo	488.1	48783.0	1034.0	47.2
	Media	394.2	8637.8	308.0	28.0
Duero	SD	± 36.7	± 3035.5	± 76.7	± 3.96
(n=6)	Mínimo	348.3	5384.6	210.0	25.6
	Máximo	437.3	12039.0	426.0	28.3
	Media	390.2	7126.1	272.8	26.1
Castilla	SD	± 28.6	± 842.3	± 24.9	± 3.37
(n=13)	Mínimo	346.6	2134	140	15.2
	Máximo	440.6	29784.0	927.0	32.1

Hay que hacer notar que la cáscara de esta especie posee de forma normal áreas de la cutícula con mayor densidad de poros intercaladas con zonas de menor densidad. Los datos expresados corresponden a la media de ambos tipos de áreas. Existen diferencias significativas en este parámetro entre la población del Algarve

y las restantes poblaciones, siendo el número de poros significativamente superior en la primera.

- *Área media de poros.*

Los resultados en μm^2 figuran en la Tabla 14 adjunta. El área de poros fue ciertamente variable entre individuos, al igual que el área total resultante. En áreas reducidas, y a grandes aumentos, pudieron discernirse poros de diferentes tamaños (Figura F3a); mientras que a baja magnificación este aspecto puede pasar desapercibido. Habitualmente, la diferencia de tamaño entre poros dentro de una misma muestra no es muy acusada. Del mismo modo no existen diferencias significativas entre poblaciones en este parámetro.

- *Superficie total de poros por unidad de superficie.*

Se trata de un dato importante ya que refleja la capacidad de intercambio gaseoso. La media, desviación estándar, máxima y mínima figuran en la Tabla 6 para cada población. Los poros tienden a la forma circular (Figura F3a) si bien no son totalmente simétricos. En correlación con lo expresado para el número de

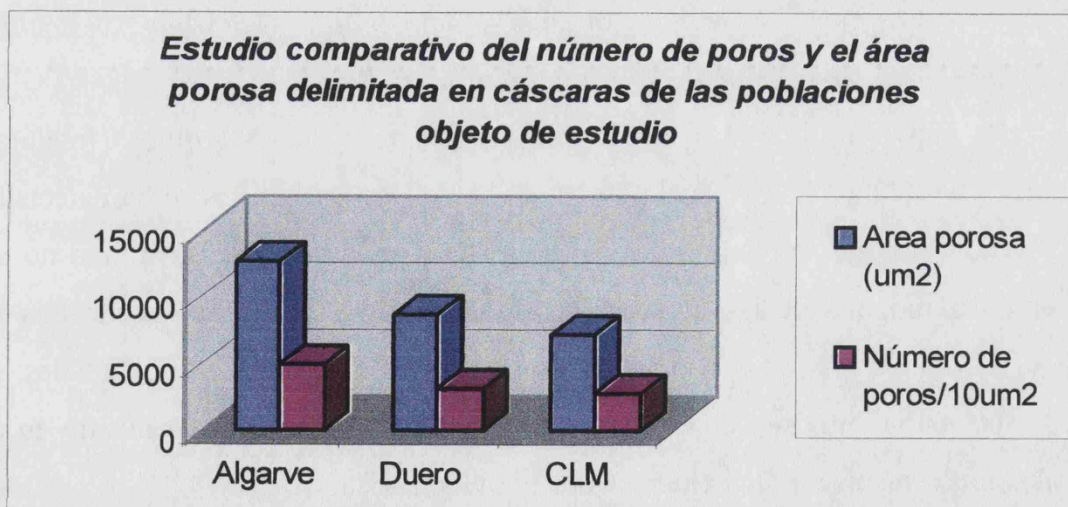


Gráfico 1: Estudio comparativo del número de poros y el área porosa delimitada, en cáscaras de las poblaciones objeto de estudio.

poros, su mayor abundancia en la población de Algarve hace que el área delimitada por los mismos sea significativamente superior en esta población cuando los datos se comparan con las restantes (Gráfico 1).

- *Grosor de cutícula.*

El grosor de la cutícula en el águila perdicera es irregular dentro de la extensión de cada muestra, existiendo áreas en las que se encuentra ausente. Su grosor varía entre 25 y 44 μm , pudiendo presentar en su superficie un aspecto más o menos irregular dependiendo de la muestra.

Objetivos

- *Presencia o no de cutícula y rasgos característicos.*

El huevo de esta especie posee cutícula que se extiende por toda la superficie del huevo variando su grosor en las diferentes áreas. En las tres poblaciones examinadas, las muestras de referencia presentaron áreas con cutícula alternando con áreas sin cutícula, distribuidas formando un patrón irregular. La cutícula estuvo presente en el 100% de las muestras seleccionadas como referencia y en todas las poblaciones incluidas en este estudio.

- *Presencia o no de estructuras adicionales: esferolitos, vesículas, material en la entrada de los poros y fracturas radiales.*

El huevo normal del águila perdicera carece de esferolitos, fracturas radiales y vesículas. La presencia de las dos primeras estructuras se ha detectado en relación con cáscaras anormales (Figura F52), mientras que la última no se observó en ninguna de las muestras analizadas. Algo semejante sucede con la presencia de material obstruyendo los poros (Figura F12) y fracturas radiales, si bien estas estructuras son comunes en otras especies, no sucede lo mismo en el águila perdicera, siendo la incidencia de aparición anecdótica.

- *Aspecto de la cutícula.*

Esta estructura sufre alteraciones dependiendo de diversos factores los cuales se detallan en otras secciones. En su superficie, la apariencia varía entre regular e irregular (Figura F3b), cuestión que pudiera estar relacionada con el

tiempo de incubación. De este modo la superficie es originalmente regular para ir apareciendo irregularidades conforme avanza el periodo de incubación en función del roce.

De forma adicional, dentro de los huevos control, se ha detectado en ocasiones la aparición de estriaciones lineales de gran extensión que, si bien no es un rasgo constante. Es posible que estas líneas, dada su trayectoria puedan estar ligadas al roce que la hembra en ocasiones realiza con el pico sobre esta superficie.

2. Capa de cristalización externa

Cuantitativos

- *Área.*

Esta capa se sitúa entre la cutícula y la capa de empalizada sí bien muchos autores no la consideran como una capa en si misma, sino dentro de la capa mamilar. Su estructura y grosor es ciertamente irregular, y se combina e imbrica con la capa de empalizada de tal modo que en las zonas en la que la primera profundiza, la segunda pierde grosor (Figura F1). El área de esta capa se expresa en μm^2 y los valores para las diferentes poblaciones figuran en la Tabla 15, apareciendo como media, desviación estándar, valor máximo, valor mínimo y número de muestras analizadas.

- *Grosor.*

Como el resto de los parámetros cuantitativos de esta capa figuran en la Tabla 15.

La irregularidad en el grosor de esta capa dependiendo del lugar elegido es una constante en esta especie (Figura F1), sin embargo las diferencias entre el grosor máximo y mínimo se atenúan en determinados individuos. El grosor medio de esta capa (78 a 101 μm), es ligeramente inferior al descrito para el águila imperial en la pasada década (118 a 128.7 μm), si bien según nuestras

observaciones en comparación con otras especies de águilas mediterráneas la irregularidad en el grosor es muy superior en el águila perdicera.

- *Número de estratos.*

Esta capa presenta cristales que se orientan de forma perpendicular a la superficie del huevo formando capas paralelas a la misma (Figura F2b). Estas capas son habitualmente de dos a tres, pero pueden llegar hasta cinco, como hemos confirmado mediante microscopía electrónica. Los estratos aparecen bien definidos y son atravesados sagitalmente por los canales correspondientes a los poros en superficie (Figura F2b).

En las zonas en las que el grosor de esta capa se reduce también lo hace el número de estratos. Esta magnitud se relaciona obviamente con el grado subjetivo de cristalización de esta capa, a mayor número de estratos mejor es el grado de cristalización.

- *Número y morfología de los canales.*

El número de canales perpendiculares a la superficie que surcan esta capa tiene origen en los poros en superficie y por tanto, su número está relacionado con el mismo (Figura F2b). El trayecto de estos canales es habitualmente rectilíneo, si bien existen alteraciones de la trayectoria y desviaciones de los mismos a modo de intercomunicaciones, que se hacen más manifiestas en la parte interna de esta capa.

Tabla 15: Características de la capa de cristalización externa en muestras de cáscara correspondientes a las diferentes poblaciones de águila perdicera.

		CAPA DE CRISTALIZACIÓN EXTERNA			
Población		Nº canales	Nº estratos	Grosor	Área externa
	Media	29.8	2.6	98.9	53398.9
Algarve	SD	10.4	1.0	16.7	8370.2
(n=21)	Mínimo	20.0	1.0	75.8	41256.4
	Máximo	69.0	5.0	142.7	72218.8
	Media	26.2	2.7	78.0	49497.1
Duero	SD	4.3	0.8	19.6	8262.4
(n=6)	Mínimo	20.0	2.0	47.5	37832.5
	Máximo	31.0	4.0	105.2	61138.3
	Media	27.3	3.5	101.0	55296.1
Castilla	SD	7.3	1.3	24.8	12893.6
(n=13)	Mínimo	19.0	1.0	53.5	28144.4
	Máximo	41.0	5.0	141.2	73104.3

La trayectoria de estos canales tiende a variar según se adentran en la porción más externa de la capa de empalizada, de modo que confluyen en zonas cónicas para formar un solo canal que atravesará el resto de la capa hasta dar salida entre la base de las mamilas (Figuras F10 y 10a). La mayor estratificación de esta capa parece afectar la morfología de los canales dándoles una mayor tortuosidad.

Objetivos

- *Estructura y grado de cristalización.*

En el águila perdicera es una capa ciertamente relevante que se sitúa por encima de la capa de empalizada y que posee un espesor muy variable en su recorrido. La orientación de los cristales es perpendicular a la superficie del huevo y se disponen en estratos diferenciados y adosados de modo que dan lugar a una estructura ciertamente compacta. El número de estos estratos en las cáscaras modelo varía entre 3 y 12 en función del grosor de la zona elegida.

El grado de cristalización, determinado de forma subjetiva, es muy bueno e implica la existencia de estratos definidos y orientación de los cristales formando 90 grados con la superficie. Esta capa se encuentra indefectiblemente en todas las muestras de águila perdicera, y el grado de cristalización y orientación de los cristales es ciertamente notable.

3. Capa de empalizada

Cuantitativos

- *Área.*

Se trata de la capa que en mayor medida contribuye al grosor total de la cáscara. En ella se han centrado la gran mayoría de las discusiones en cuanto al grado de cristalización de la cáscara, el grosor y su alteración como consecuencia del uso de pesticidas organoclorados. Los resultados de las mediciones del área se muestran en la Tabla 16.

En esta especie, el área de esta capa es aproximadamente doble del área de la capa de cristalización externa (Figura F1), una relación superior a la existente por ejemplo en el águila imperial, lo que da una idea de la importancia de la misma.

Como límite inferior se ha considerado la porción superior de la capa de los conos. Este límite está generalmente muy bien definido en otras especies de rapaces como el águila imperial (*Aquila adalberti*) o el águila real (*Aquila*

chrysaetos), por lo que resulta sencillo establecer una clara demarcación, ya que aparece como la base de los cuerpos poliédricos que conforman esta capa.

Existen diferencias notables en esta capa entre las poblaciones incluidas en este estudio. En la población del Algarve, en el 90% de los individuos analizados aparece una banda de estratos tendentes a la perpendicularidad con el eje de las columnas poliédricas, que asemeja a la estructura de la capa de cristalización externa. Esta capa limita con los conos mamilares, y se diferencia notablemente de los mismos.

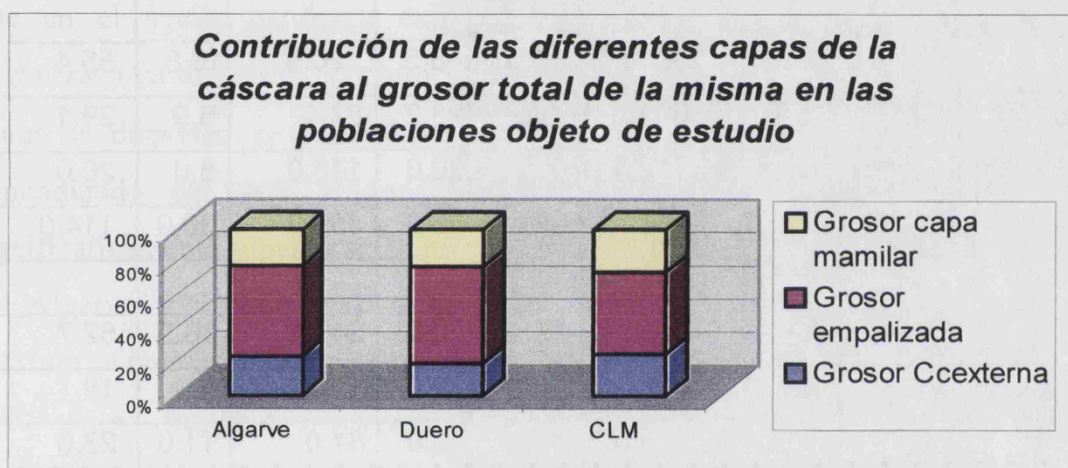


Gráfico 2: Contribución de las diferentes capas de la cáscara al grosor total de la misma en las poblaciones objeto de estudio.

Dentro de esta capa se diferencian, en los casos en los que alcanza mayor grosor, unos estratos poco definidos debido a la naturaleza amorfa de los cristales presentes (Figura F33 y F34). El grosor de esta estructura dentro de la capa de empalizada es variable y, dependiendo del individuo, puede llegar a representar un quinto del grosor de la capa de empalizada, y una décima parte del grosor total de la cáscara. En las poblaciones restantes, esta banda de cristalización aparece en algunos individuos en la población del Duero, y esta ausente en la población

Castellano - Manchega salvo raras excepciones en las que aparece de forma irregular (Gráfico 2).

Tabla 16: Características de los diferentes parámetros asociados a la capa de empalizada en las diferentes poblaciones de águila perdicera estudiadas.

Población		Grosor	Área	CAPA EMPALIZADA			Área min	Nº de poros
				Ángulo	Área max	Nº de vesículas		
	Media	229.5	114038.1	10.5	48.5	226.9	16.8	55.4
Algarve	SD	21.5	8260.5	7.1	23.2	87.1	6.9	29.1
(n=21)	Mínimo	186.5	99117.8	0.7	20.0	116.0	8.0	20.0
	Máximo	271.0	131151.7	20.0	96.0	452.0	30.0	114.0
	Media	234.2	113323.1	12.4	56.3	241.2	16.2	52.7
Duero	SD	28.9	17076.1	10.4	11.6	120.3	6.0	18.1
(n=6)	Mínimo	184.0	82854.8	5.3	42.0	84.0	11.0	23.0
	Máximo	264.0	129762.8	32.2	72.0	404.0	27.0	72.0
	Media	201.8	101047.1	10.2	54.0	258.6	12.8	32.8
Castilla	SD	19.6	10742.6	7.4	22.0	162.1	9.5	17.3
(n=13)	Mínimo	158.3	81804.4	0.7	12.0	43.0	3.7	14.0
	Máximo	231.4	117804.6	24.9	80.0	528.0	30.0	61.0

La presencia de esta capa conlleva un aumento considerable del grosor total de la cáscara, que se hace especialmente relevante en la población del Algarve, siendo las diferencias en grosor significativas con respecto a la población castellana.

- *Número de vesículas.*

En la capa de empalizada del huevo de las aves aparecen una serie de formaciones vesiculares que dan lugar a la denominación de capa espongiiforme, asemejando la textura de una esponja (Figura F5). Se trata de vesículas de aire que se disponen de forma irregular por toda la capa. Dependiendo de la orientación del corte a nivel de las columnas poliédricas, estas aparecen en mayor o menor número (Figuras F5a y F5b).

La matriz orgánica de esta capa se concentra en la base, y la densidad de la capa aumenta según se avanza hacia el exterior. Del mismo modo, se ha observado que en el águila perdicera existen pequeños canalículos que atraviesan la empalizada en dirección perpendicular al eje de las columnas romboédricas. Estas fibras se disponen en hileras con una distancia regular de entre 2 y 15 μm dependiendo del área (Figura F5). El número de vesículas es también significativamente superior en la población Castellana en relación con la población del Algarve, afectando tanto al área mínima (Figura F31a y F31b) como a la máxima en cuanto a número de vesículas.

- *Ángulo de orientación de los cristales.*

Las columnas romboédricas que conforman gran parte de la capa de empalizada son muy aparentes en esta especie, dando un aspecto de cristalización y solidez ciertamente característicos. Estas estructuras se imbrican en la capa de cristalización externa, a diferentes niveles en función del grosor de ésta. Por el contrario, su base se sitúa siempre a un nivel similar dentro del espesor de la cáscara, marcado por la capa mamilar. La orientación de estas columnas es aproximadamente perpendicular a la superficie de la cáscara cuando el grado de cristalización es adecuado. La variación en el ángulo de orientación es reducida, y semejante en todas las poblaciones, oscilando entre 0.7° y 32° de desviación con respecto al eje vertical (Figura F1). Esta desviación puede ser positiva o negativa según las columnas. Los resultados se exponen en la Tabla 8.

- *Grosor.*

Este parámetro es variable en función del punto elegido y el espesor de la capa de cristalización externa. La población Castellano - Manchega muestra una disminución del grosor de esta capa en torno a un 15% con respecto a los valores observados en las otras poblaciones (Figura F33 y F34)(Gráfico 3).

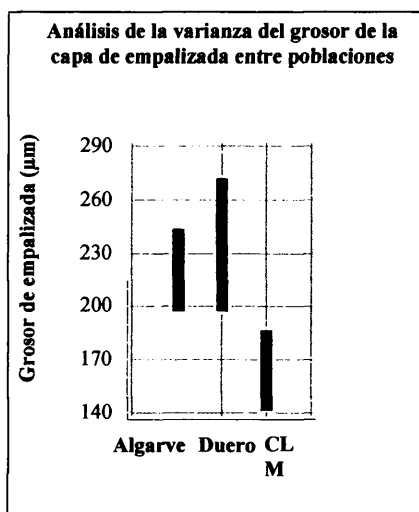


Gráfico 3: Análisis de la varianza del grosor de la capa de empalizada entre poblaciones.

Estas diferencias no se acompañan de diferencias significativas en el grado de cristalización. Los grosores fluctúan entre 184 y 271 µm en las poblaciones portuguesas, situándose las medias entorno a los 230 µm. Estos grosores son semejantes a los referidos para el águila imperial en el pasado siglo, y superiores a los actuales para esta especie.

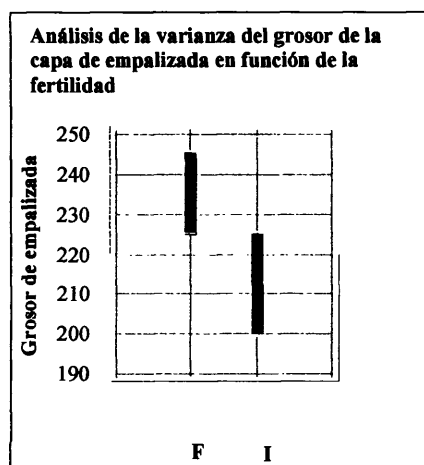


Gráfico 4: Análisis de la varianza del grosor de la capa de empalizada en función de la fertilidad.

El huevo de esta última especie es superior en peso y tamaño, lo que indica la importancia de esta capa en el águila perdicera. La disminución del grosor de esta capa se relaciona con infertilidad (Gráfico 4).

Objetivos

- *Grado de cristalización.*

En el águila perdicera los cristales de la capa de empalizada se organizan dando lugar a enormes formaciones romboédricas (Figura F45), cuya orientación es perpendicular a la superficie del huevo como ocurre en otras aves. En el 14.8% de las cáscaras examinadas, el grado de cristalización fue muy bueno, mientras que en un 12.9% de los casos este parámetro subjetivo fue ciertamente deficiente (Figura F 46 y F46a). La zona mas interna de esta capa, la unión con la capa de los conos mamilares, posee especial interés y en las muestras referencia la cristalización avanza penetrando en la capa de los conos. A este nivel, existen diferencias notables entre poblaciones.

En la población del Algarve las formaciones romboidales tan solo alcanzan la superficie de los conos en ciertas localizaciones, mientras que en otras se continúa con una estructura de cristalización semejante a la de la capa de cristalización externa (Figura F37 y F37a). Sin embargo, a menudo los cristales pueden variar en sus dimensiones forma y orientación, adoptando el aspecto de un conglomerado en ocasiones caótico. En aquellas localizaciones en las que aparece, su límite inferior está ciertamente marcado en su confluencia con la capa de los conos.

La incidencia de esta formación es distinta en las diferentes poblaciones. Así, aparece en todas las muestras referencia correspondientes a la población del Algarve, mientras que en las demás poblaciones su presencia es mínima o inexistente (Figura F38 y F38a).

4. Capa mamilar.

Cuantitativos

- *Grosor.*

Los valores relativos al grosor en μm de esta capa en las diferentes poblaciones figuran en la Tabla 17. Comparativamente, se aprecia un mayor grosor medio en las muestras procedentes de la población Castellana (Figura F33 y F34), si bien este aumento no es significativo. El grosor total es muy inferior al de la cáscara de otras especies de águila de su ámbito como el águila real o el águila imperial, en las que este parámetro se sitúa en valores medios de 190 y 160 μm aproximadamente.

- *Área mamilar al corte.*

Los valores para cada una de las poblaciones se compilan en la Tabla 17. No se aprecian diferencias significativas entre poblaciones en este parámetro. La forma de la mamila al corte puede variar entre plana, convexa y cónica (Figuras F41 y F42). Esta morfología está relacionada con diversos aspectos entre los que reseñamos: La fertilidad o infertilidad del huevo, la edad del embrión, la presencia

de fenómenos de multinucleación y la localización geográfica, aspectos que se analizan en los capítulos correspondientes.

- *Área del sistema de ventilación mamilar y distancia entre mamilas.*

Se trata del área entre mamilas expresada en μm^2 (Figura F4), y los resultados para cada población quedan reflejados en la Tabla 17.



Gráfico 5: Relación entre el área libre entre mamilas y la densidad de las mismas en las diferentes poblaciones.

Se trata de un parámetro importante, ya que aumenta notablemente en los casos en los que aparece distribución irregular de las mamilas, lo que puede contribuir a una pérdida de fortaleza en la estructura global de la cáscara. Existen diferencias significativas entre la población Castellana (Figura F51) y la población del Algarve, siendo esta área entre un 10% y un 12% superior en la primera.

- *Distancia entre mamilas.*

La distancia entre mamilas se expresa en μm (Figura F4a) no existiendo diferencias significativas entre poblaciones.

Tabla 17: Características de los parámetros correspondientes a la capa mamilar en las diferentes poblaciones de águila perdicera.

				CAPA MAMILAR				
Población		Área al corte	Grosor	Área intermamilar	Distancia entre mamilas	Area mamilar	Número de mamilas	
	Media	51183.6	92.4	9421.7	105.8	264935.6	41.4	
Algarve	SD	17189.0	15.7	2124.5	26.5	89015.7	11.1	
(n=21)	Mínimo	34075.5	70.2	6896.9	76.1	127432.8	20.0	
	Máximo	120282.9	120.9	14418.6	189.6	455755.7	58.0	
	Media	49066.2	90.1	10236.3	108.4	187718.7	37.3	
Duero	SD	8647.4	17.5	4780.5	26.4	86911.4	19.7	
(n=6)	Mínimo	36888.0	65.7	5554.7	73.2	107597.7	23.0	
	Máximo	62720.0	118.1	16268.7	140.7	356868.8	74.0	
	Media	52116.5	103.2	11666.6	107.2	209920.6	34.8	
Castilla	SD	9903.1	17.6	3402.2	42.2	152190.1	23.6	
(n=13)	Mínimo	8722.4	79.1	6607.3	67.2	45673.1	5.0	
	Máximo	76145.0	144.9	17399.2	224.9	520242.0	101.0	

- *Número de mamilas y área mamilar.*

Los resultados figuran en la Tabla 17. Se ha constatado un descenso significativo del número de mamilas en la población Castellana (Figura F15) y del Duero. La fusión de mamilas como parte de un proceso global de multinucleación es un hecho constatado en esta población, lo que reduce el número total de mamilas en un 18% aproximadamente. El área total de superficie mamilar (Figura F4a) disminuye de forma similar, lo que hace que la diferencia en este parámetro

sea de aproximadamente de un 30% y 21% para las poblaciones del Duero y Castilla - La Mancha respectivamente, con respecto a la población del Algarve.

- *Superficie de los núcleos mamilares.*

Es un aspecto importante ya que de él dependen el crecimiento de los cristales de la capa mamilar y, en parte, la adherencia de las fibras de la membrana externa a la capa mamilar (Figura F39). Los resultados se expresan en μm^2 quedando compilados en la tabla adjunta. El área de estos núcleos sufre una disminución muy importante en el caso de las poblaciones del Duero y Castilla con reducciones medias del 52% y 37% respectivamente (Figura F24).

- *Número de núcleos y distancia entre núcleos.*

Los valores en referencia a cada población figuran en la Tabla 18. Se ha observado que el número total de núcleos por unidad de superficie disminuye de forma notable en las poblaciones del Duero y Castilla en comparación con la

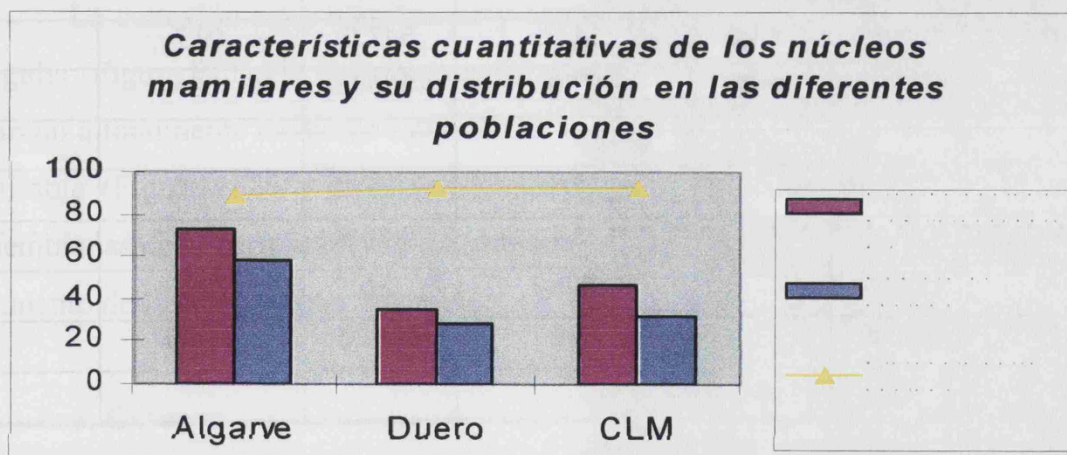


Gráfico 6: Características cuantitativas de los núcleos mamilares y su distribución en las diferentes poblaciones.

población del Algarve. Las reducciones se cifran en 52% y 47% para cada población respectivamente (Gráfico 6). Sin embargo, la distancia media entre núcleos (Figura F4) permanece invariable entre poblaciones. El número total de

Tabla 18: Características de los núcleos mamilares en las diferentes poblaciones de águila perdicera.

			NUCLEOS MAMILARES			
Población		Área	Número	Área de fisuras	Distancia entre núcleos	
	Media	7319.5	58.4	5179.7	88.1	
Algarve	SD	4749.8	29.9	6700.0	29.3	
(n=21)	Mínimo	1445.8	20.0	526.0	65.2	
	Máximo	18576.9	135.0	25789.6	160.4	
	Media	3528.7	28.5	12185.7	91.6	
Duero	SD	5047.6	26.1	15758.5	22.4	
(n=6)	Mínimo	744.4	11.0	547.0	49.7	
	Máximo	11095.0	67.0	43380.9	109.4	
	Media	4627.2	31.4	2786.5	91.8	
Castilla	SD	4077.3	23.1	3279.8	15.1	
(n=13)	Mínimo	865.2	5.0	0.0	73.2	
	Máximo	12219.8	75.0	9211.5	114.0	

Objetivos.

- *Grado de multinucleación.*

Los fenómenos de multinucleación no aparecen en cáscaras normales de esta especie. Esta anomalía aparece de forma mas frecuente en las poblaciones del Duero y castellana (Figura 50).

- *Forma, tamaño y distribución de las mamilas.*

Los conos mamilares presentaron las formas habituales descritas para otras especies. En el águila perdicera, los conos son pequeños con un diámetro aproximado entre 65 y 140 μm . La forma es ciertamente variable en su área de contacto con las membranas testáceas, pero es en general circular con ligeras ondulaciones. En su sección transversal la forma es convexa, con una cierta prominencia, pero sin llegar a ser cónica ni excesivamente plana (Figura F41 y F42).

La distribución de las mamilas es regular, disponiéndose de forma ordenada y compacta en su superficie de contacto con las membranas. En general, quedan pocos huecos entre mamilas y, en la base, se encuentran abigarradas y firmemente unidas sin dejar fisuras importantes. Tan solo en los huecos correspondientes a la salida de los poros se aprecia la separación precisa.

- *Conexión con membranas testáceas.*

La conexión entre membranas y conos mamilares en el águila perdicera es regular (Figura F11). En las muestras de referencia las membranas se separaron de parcial a totalmente mediante tratamiento ácido. El grado de adherencia puede ser variable (Figuras F39 y F40) quedando reflejado durante la separación de las membranas de la capa mamilar. En ninguno de los huevos referencia se detectó un aumento de la adherencia a este nivel.

5. Cáscara

Cuantitativos

- *Grosor total.*

Los grosores totales correspondientes a las tres poblaciones se han expresado en μm como medias y desviaciones estándar que figuran en la Tabla 14. Los resultados indican un 5% de disminución en el grosor total de la cáscara en las poblaciones de Castilla y Arribes del Duero (Figuras F33 y F34). Esta reducción es estadísticamente significativa, pero un tercio aproximadamente de la detectada en otros rapaces como el águila imperial o el águila real, en las que se ha sugerido

como causa del bajo éxito reproductor. De este modo se constata que la máxima reducción en el grosor de la cáscara en la población de Castilla se debe en su totalidad a la reducción en el grosor de la capa de empalizada. Esta se palia de algún modo mediante ligeros aumentos en el grosor de la capa mamilar en esta población.

6. Membranas testáceas

Cuantitativos

- *Grosor total.*

Es la suma de los grosores de cada una de las dos membranas que la componen, figurando estos en la Tabla 19. Es necesario hacer ciertas observaciones, los datos referentes a la población de los Arribes se han adjuntado como meras puntualizaciones y no pueden tomarse como representativos debido a la escasez de muestras. De los resultados se deduce que el grosor total es similar en las poblaciones en las que el número de muestras es suficientemente representativo, siendo de entre 120 y 141 μm . Resulta complejo establecer comparaciones con otras especies, ya que estos aspectos prácticamente no han sido estudiados en aves salvajes.

En comparación con la membrana en el huevo de gallina, el grosor de la suma de ambas membranas es aproximadamente el doble en el águila perdicera. Las medidas han de tomarse con cautela, ya que esta capa es obviamente mas sensible a los agentes meteorológicos de modo que pueden deteriorar la calidad de la muestra especialmente en el caso de restos de cáscara con membranas adheridas.

6.1. Membrana externa

Cuantitativos.

- *Número de fibras.*

El número de fibras se sitúa entre 26 y 34 por cada 100 μm lineales, sin que se puedan establecer diferencias significativas entre poblaciones en este sentido (Figura F7). Las variaciones individuales se han referido como importantes en esta estructura del huevo en aves. En el águila perdicera, las desviaciones standard son valores elevados sí bien no en exceso.

- *Diámetro de fibras.*

El diámetro medio (Figura F7a) de las fibras es significativamente superior en la población del Algarve lo que va asociado a un número medio de fibras ligeramente inferior (Gráfico 7). Las fibras se componen mayormente de una cubierta de carbohidratos seguida de lípidos rodeando un núcleo proteico. En ausencia de estudios más precisos, resulta imposible discernir en las posibles causas de una disminución o aumento general del grosor.

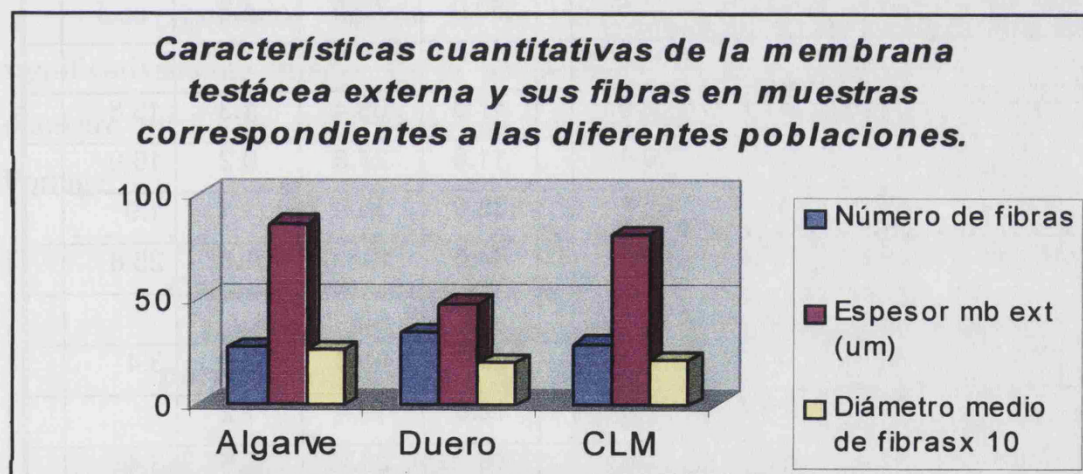


Gráfico 7: Características cuantitativas de la membrana testácea externa y sus fibras en muestras correspondientes a las diferentes poblaciones.

- *Grosor de la membrana.*

Los resultados figuran en la Tabla 19, si bien resulta difícil establecer conclusiones ante las diferencias individuales y el estado de conservación de la muestra.

Tabla 19: Características de los parámetros correspondientes a las membranas testáceas en las diferentes poblaciones de águila perdicera estudiadas.

MEMBRANAS DE LA CÁSCARA									
		Membrana externa				Membrana interna			
Población		Número de fibras	Espesor	Diámetro medio		Número de fibras	Espesor	Diámetro medio	albugínea
	Media	26.7	85.5	2.6		35.4	56.7	2.1	
Algarve	SD	5.7	20.6	0.8		8.3	14.8	0.8	
(n=21)	Mínimo	17.0	59.0	1.4		23.0	34.0	1.3	
	Máximo	42.0	113.0	4.5		50.0	73.0	4.3	
	Media	34.3	47.8	2.0		47.0	58.4	1.3	13.8
Duero	SD	5.3		0.4		11.6	27.6	0.2	16.9
(n=6)	Mínimo	27.0	47.8	1.7		38.0	36.9	1.1	1.9
	Máximo	39.0	47.8	2.6		64.0	106.0	1.5	25.8
	Media	28.8	80.4	2.1		28.7	39.3	2.9	3.4
Castilla	SD	8.9	29.4	0.6		12.6	13.4	1.2	
(n=13)	Mínimo	14.0	46.0	1.6		16.0	23.1	1.5	3.4
	Máximo	36.0	142.0	3.3		47.0	66.0	5.0	3.4

Objetivos.

- *Distribución de fibras.*

La distribución de las fibras de la membrana externa es regular, ciertamente abigarrada pero menos densa que la capa interna. Las fibras son bifurcadas pero no

se entrelazan sino que se aposicionan en múltiples capas que se hacen más densas conforme se avanza hacia el interior. De forma adicional el grosor de las fibras disminuye en la misma dirección. Algunas de las fibras de esta capa penetran hacia el interior de las membranas entrelazándose con la capa interna.

En la superficie de las fibras, en ocasiones se observan pequeños mamelones y vesículas. De nuevo se aprecian diferencias entre poblaciones. Mientras en la población de El Algarve estas vesículas aparecen con cierta frecuencia (92% de las muestras examinadas) (Figura F26, F47 y F47a), en la población española rara vez se presentan (12%) (Figura F25).

6.2. Membrana interna.

Cuantitativos.

- *Número y diámetro de fibras.*

Los resultados figuran en la tabla 19. El número de las fibras es significativamente inferior en la población española mientras que aumenta el diámetro medio de estas fibras en comparación con la población del sur de Portugal.

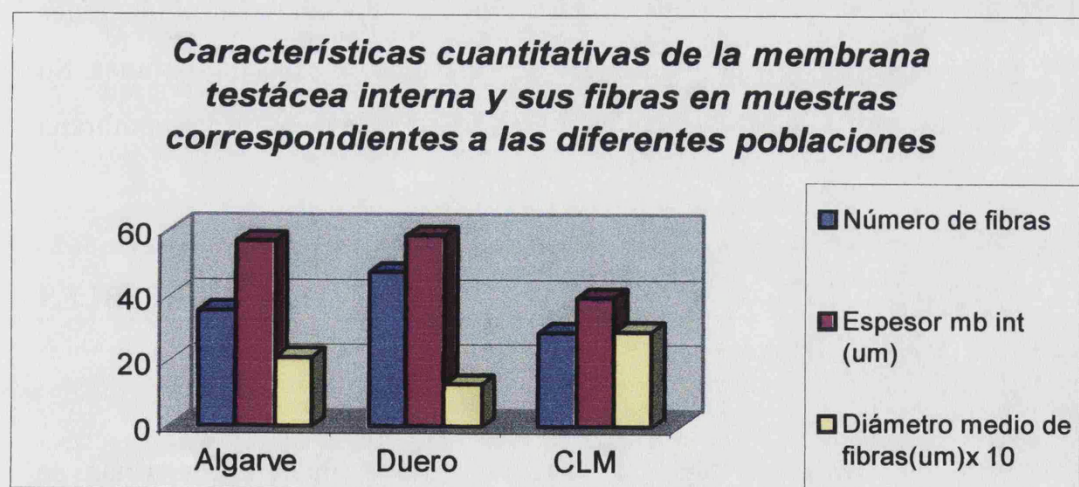


Gráfico 8: Características cuantitativas de la membrana testácea interna y sus fibras en muestras correspondientes a las diferentes poblaciones.

- *Grosor de la membrana interna.*

Es ciertamente difícil de discernir en algunos casos debido al grado de deterioro. En general, el grosor total de esta capa se sitúa entre 39 y 58 μm (Figura F6).

- *Presencia de capa albugínea:*

Del total de las muestras analizadas, en tres se encontró la capa albugínea (Figura F9). Es una capa de apariencia pétrea, que se ha denominado por otros autores como capa de cemento albuminoso. Se sitúa entre las fibras de la membrana interna en el límite con el albumen. Su aparición es ciertamente irregular sin que conozcamos hasta el momento la causa. Su grosor varía entre 1.95 y 3.36 μm siendo éste ciertamente regular en toda su extensión. Esta capa empapa la porción más interna de la membrana interna, en el límite con la misma.

Objetivos.

- *Distribución de fibras.*

Las fibras de la membrana interna se distribuyen de forma regular y poseen mayor densidad que las fibras de la membrana externa dejando pocos huecos entre fibras (Figura F8 y F8a). En la mayoría de los casos y en todas las poblaciones aparecen vesículas muy pequeñas adheridas a la superficie de estas membranas. Su tamaño es muy inferior al de las vesículas presentes en ocasiones en la membrana externa.

I.3 TENDENCIAS Y CORRELACIONES ENTRE VARIABLES CUANTITATIVAS Y NO CUANTITATIVAS

Conforme a los coeficientes de correlación de Pearson y Spearman se estableció el grado de asociación entre todas las variables incluidas en este estudio: cuantitativas, objetivas y subjetivas. Tan solo se hará referencia en este

apartado a aquellas correlaciones que han resultado significativas indicando el grado de significación.

El grado de dependencia de las variables cuantitativas con respecto a aspectos cualitativos, o la presencia de alteraciones se analizó mediante análisis de la varianza. Se observó que existen diferencias significativas entre grados de afección.

1. Cutícula

Cuantitativos

- *Número total de poros por unidad de superficie.*

El número de poros y el área total de intercambio gaseoso se correlaciona positivamente con el grosor total, grosor y área de la capa de empalizada, área entre mamilas y área mamilar. Por el contrario, se vincula negativamente con el área y grosor de la capa mamilar.

Objetivos

- *Presencia o no de cutícula y rasgos característicos.*

Existe una correlación positiva ($p=0.0426$), entre la presencia de mayores áreas de cutícula y la de material obstruyendo los poros. Del mismo modo la aparición de áreas extensas de cutícula se asoció positivamente ($p=0.0459$), a la presencia de fracturas radiales en la cutícula.

La existencia y abundancia de cutícula se relacionaron de forma significativa ($p=0.01$) con la presencia de vesículas en las membranas de la cáscara.

Las cáscaras con cantidades de cutícula muy reducida difirieron significativamente ($p=0.01$), en el área de superficie mamilar, de aquellas en las que se observaron áreas de medias a extensas. Estas últimas mostraron áreas ciertamente reducidas en comparación con la primera.

Los resultados indican que efectivamente la presencia de superficies amplias de cutícula, se relaciona significativamente con una menor área de

intercambio gaseoso y un menor número de poros a nivel de superficie externa de la cáscara. En ambos casos los niveles de significación se cifran en $p=0.05$.

- *Presencia o ausencia de estructuras adicionales: esferolitos, vesículas, material en la entrada de los poros y fracturas radiales.*

La aparición de material en poros se relacionó positivamente con la presencia de fracturas radiales ($p=0.0484$). Sin embargo la correlación es significativa, pero negativa, entre la presencia de fracturas y el grado de cristalización de la capa de empalizada. Esto implica que la presencia de fracturas esta ligada a grados deficientes de cristalización.

Objetivos

- *Aspecto de la cutícula.*

Las muestras que mostraron un aspecto irregular en su superficie, alcanzaron grosores de la capa mamilar significativamente superiores a aquellas que presentaron un aspecto regular de la cutícula.

2. Capa de cristalización externa

Cuantitativos

- *Área.*

El área y el grosor de esta capa se encuentran obviamente relacionados con un alto grado de significación.

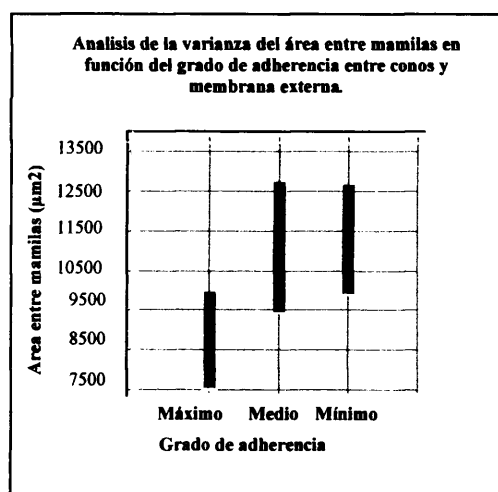


Gráfico 9: Análisis de la varianza del área entre mamilas en función del grado de adherencia entre conos y membrana externa.

Una disminución en el área de esta capa se relaciona significativamente con la presencia del fenómeno de fusión de fibras.

- *Número de estratos.*

Este parámetro aumenta con el aumento del área de la capa de cristalización externa. Existe además una tendencia a correlacionarse con el grosor de dicha capa con una significación según Pearson de ($p=0.07$). En esta capa la cristalización es perpendicular a la superficie, pero los cristales se aposicionan formando capas que se extienden paralelamente a la superficie de la cáscara.

- *Número de canales.*

El número de canales encontrados en esta capa al corte se correlaciona significativamente con el grosor total de la cáscara, tal y como explicaremos detalladamente en el apartado correspondiente. Además se relaciona de forma positiva con el número de estratos presentes en la capa externa.

Objetivo

- *Estructura y grado de cristalización.*

A mejor grado de cristalización mayor es el área de la capa de cristalización externa.

El grado de cristalización de la capa externa se ha correlacionado positivamente con tres variables distintas: El grado de cristalización de la capa de empalizada ($p=0.0104$), el grado de adhesión entre la capa de los conos mamilares y la membrana testácea externa ($p=0.0328$), y la fertilidad del huevo ($p=0.0456$).

3. Capa de empalizada

Cuantitativo

- *Número de vesículas.*

En el corte se han clasificado dos tipos de áreas: Las más porosas y las de escaso número de poros. Existe una correlación positiva entre el número de vesículas presentes en el área más porosa y en la menos. Los ANOVA incluidos en

el análisis de regresión simple, entre el número de vesículas en estas áreas y el número de poros en superficie indican que existe una correlación significativa entre ambas variables. De idéntica manera, existe una relación significativa entre el número de vesículas y el grosor total de la cáscara pero en este caso el vínculo entre variables es menor cuando se aplica el R cuadrado.

- *Grosor*

El grosor de esta capa se relaciona con el número de poros por unidad de superficie, en el exterior de la cáscara. La relación es positiva, a mayor grosor mayor numero de poros

Objetivo

- *Grado de cristalización.*

Cuanto mejor es el grado de cristalización de la capa de empalizada mejor es el grado de cristalización de la capa de cristalización externa.

4. Capa mamilar

Cuantitativo

- *Grosor*

El grosor de esta capa se relaciona con el número de poros por unidad de superficie en el exterior de la cáscara y también con la superficie total de intercambio gaseoso. La relación es negativa, a menor grosor mayor número de poros.

Existe una correspondencia positiva con significaciones entre 0.001 y 0.02, entre este parámetro y el área mamilar, la distancia entre mamilas y el área entre mamilas. Esta correlación es mas significativa entre el grosor y el área entre mamilas.

- *Área.*

Se relaciona positivamente con el grosor de esta capa. El coeficiente de Spearman, debido a que computa rangos de valores de datos en lugar de los datos en sí, y por tanto es menos sensible a los “outlayers”, incorpora una relación

negativa entre este parámetro, el número de poros y el área de intercambio gaseoso. El grado de significación de ésta, es inferior a la establecida entre las dos ultimas variables y el grosor de esta capa

- *Área del sistema de ventilación mamilar.*

Se relaciona positivamente con la distancia entre mamilas. La correlación es altamente significativa.

- *Número de mamilas*

El número de mamilas definidas se correlaciona negativamente con el número de poros y su área, el grosor total de la cáscara, el área mamilar y entre mamilas.

- *Área de mamilas*

Se correlaciona positivamente con el área de núcleos de calcificación, el área mamilar, y el área de intercambio gaseoso; pero negativamente con el número de mamilas

- *Número de conos*

Se vincula positivamente con el área de mamilas, el área de núcleos, y el número de poros y su área. Sin embargo, lo hace negativamente, aunque con evidente menor significación, con el número de mamilas claramente diferenciadas. El número de estos núcleos se relaciona positivamente con el diámetro medio de las fibras y negativamente con el número de las mismas.

- *Superficie total y media de los núcleos mamilares.*

De forma idéntica a lo que se apuntaba para el número de conos, el área total de los mismos se relaciona negativamente con el número de mamilas.

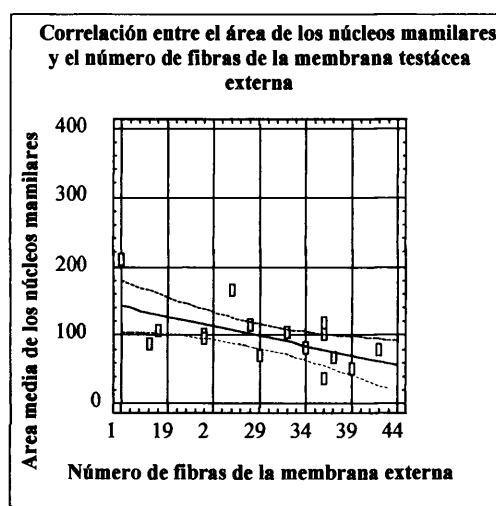


Gráfico 10: Correlación entre el área de los núcleos mamilares y el número de fibras de la membrana testácea externa

La superficie media de los núcleos se relaciona positivamente con el número de núcleos, y negativamente con el número de fibras de la membrana externa (Gráfico 10). La regresión simple establecida en este último caso mediante el uso de modelo lineal se ajusta a las necesidades y contiene un grado de correlación entre variables muy elevado.

- *Distancia media entre núcleos*

Cuanto mayor es la distancia entre núcleos menor es el número de mamilas y mayor el número de núcleos. Esta tendencia es muy significativa, al igual que la correlación positiva existente entre este parámetro, el número de poros, el área de los mismos, el área entre mamilas, el área mamilar, y el grosor total de la cáscara.

Objetivos.

- *Grado de multinucleación*

El grado de multinucleación se asocia negativamente ($p=0.0488$), con un aumento en el tamaño de las mamilas, lo que implica que el fenómeno de multinucleación no necesariamente da lugar a un aumento en el tamaño general de las mamilas.

- *Forma, tamaño y distribución de las mamilas.*

La forma de la mamila puede ser desde plana a casi cónica. Los resultados indican que las formas cónicas cursan con espacios entre mamilas significativamente superiores a las formas planas. La media en el primer caso prácticamente dobla la obtenida en el segundo.

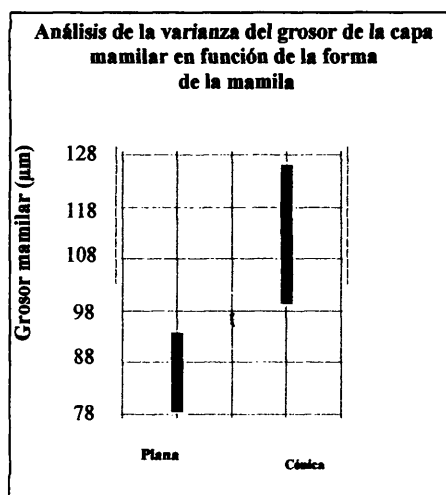


Gráfico 11: Análisis de la varianza del grosor de la capa mamilar en función de la forma de la mamila.

Del mismo modo, las formas cónicas presentan grosores de la capa mamilar significativamente superiores a las formas planas o intermedias (Gráfico 11).

Las cáscaras con mamilas planas presentan un número significativamente superior de estratos en la capa de cristalización externa en comparación con las muestras con mamilas cónicas. Las membranas de la cáscara y la capa mamilar están ciertamente relacionadas. En este sentido, la presencia de formas cónicas parece derivarse de membranas internas con un número significativamente superior de fibras.

A mayor tamaño de las mamilas menor es el grado de adherencia que presenta esta capa con la membrana externa de la cáscara. Tamaños reducidos de mamilas se asocian significativamente con un aumento del área de vesículas en la capa de empalizada y una disminución del diámetro de las fibras de la membrana interna (Gráfico 12).

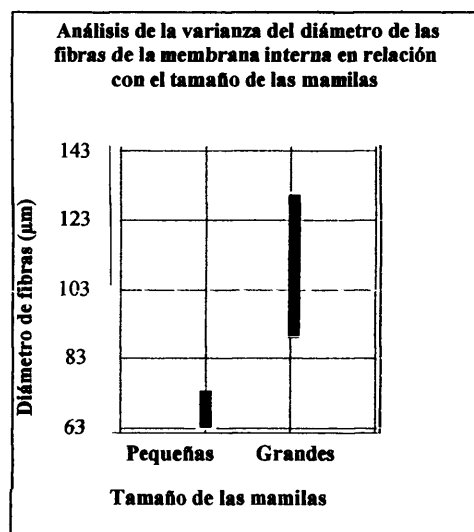


Gráfico 12: Análisis de la varianza del diámetro de las fibras de la membrana interna en relación con el tamaño de las mamilas.

Los resultados estadísticos derivados del ANOVA de una vía indican, que el área entre mamilas y el ángulo de inclinación de las columnas poliédricas sobre la vertical, son significativamente superiores en aquellas muestras que presentan distribuciones de mamilas muy irregulares. Por el contrario, el número de

mamilas, superficie mamilar y estratos de la capa de cristalización externa es significativamente inferior en distribuciones irregulares.

- *Conexión con membranas testáceas.*

Al margen de la relación con el tamaño de las mamilas referidas anteriormente, existe una correlación positiva y significativa entre esta adherencia y el grado de cristalización de la capa de cristalización externa. El ANOVA de una vía constata que existe una relación significativa entre el área entre mamilas y el grado de adherencia con las membranas de la cáscara (Gráfico 13). Áreas reducidas dan lugar a una adherencia superior.

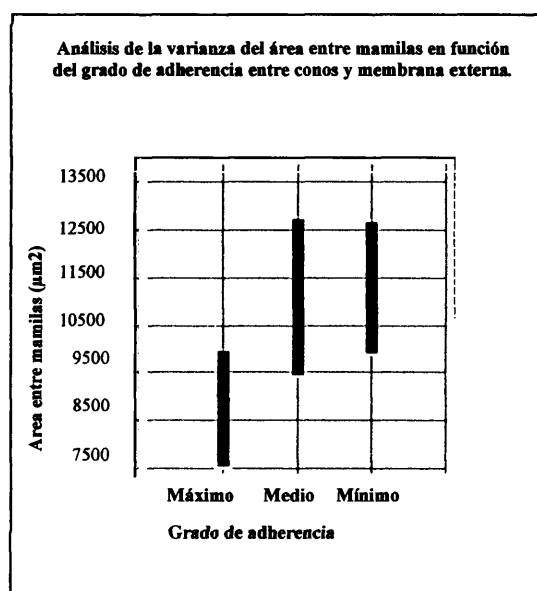


Gráfico 13: Análisis de la varianza del área entre mamilas en función del grado de adherencia entre conos y membrana externa.

5. Cáscara

Cuantitativos

- *Grosor total.*

El grosor total de la cáscara se correlaciona significativamente con algunas de las variables indicativas del tamaño de cada una de las capas que componen la cáscara en el águila perdicera incluyendo: El grosor y área de la capa de

cristalización externa, la capa de empalizada y la mamilar. Todas las correlaciones fueron positivas y mostraron un grado muy elevado de significación ($p=0.001$ a $p=0.01$). No obstante, los vínculos más significativos se encontraron entre el grosor total y el área total de la capa de cristalización externa. Las otras dos capas mostraron significaciones similares aunque opuestas comparando área y grosor.

De forma adicional, el grosor total fue superior en aquellas cáscaras con mayor número de canales correspondientes a poros visualizados en el corte de la capa de cristalización externa.

Se relaciona positivamente además con el área mamilar, el área entre mamilas y el área total de intercambio gaseoso.

En el caso del águila perdicera, los análisis demuestran que existe una cierta tendencia a la significación ($p=0.12$), en la relación entre la longitud del huevo y el grosor de la cáscara. Sin embargo, cuando se comparan el grosor y el ancho de la cáscara la relación es muy significativa ($p=0.007$). La correlación entre el volumen del huevo y el grosor de la cáscara no resultó significativa en el águila perdicera.

6. Membranas testáceas

6.1. Membrana externa

Cuantitativo

- *Número de fibras.*

A mayor número de fibras en esta membrana mayor es el número de las mismas en la membrana interna.

- *Diámetro de fibras.*

El diámetro medio de las fibras de la membrana externa se vincula significativa pero negativamente con el número de fibras. Esto implica que cuanto más gruesas menor es la densidad de las mismas. El aumento en el diámetro medio de estas fibras se correlaciona muy significativamente ($p=0.02$) y de forma positiva con el área mamilar al corte. Semejante relación se establece entre esta variable y el número de núcleos mamilares o su área. La relación entre la distancia

media entre núcleos y el número de fibras es igualmente positiva con un importante grado de significación.

Objetivo

- *Distribución de fibras.*

Existe una correlación positiva ($p=0.0010$), entre la distribución regular o irregular de las fibras de la membrana externa y el mismo parámetro en la membrana interna. Cuanto más regular es la distribución de las fibras en una, más regular es en la otra. Los análisis estadísticos indican que el modelo lineal utilizado explica un 73.05 % de la variabilidad de la distribución de las fibras de la membrana externa, siendo la correlación entre ambas variables muy sólida. Distribuciones irregulares de las mamilas presentan un número significativamente superior de poros en superficie, acompañado de un grosor superior de la capa mamilar. Similares correlaciones se han encontrado en la relación entre la distribución de las fibras internas y estas dos últimas variables.

El fenómeno de fusión de fibras se correlaciona con una disminución del área de nucleación y del número de núcleos. La presencia de fusión de fibras se traduce en una disminución significativa del grosor y área de la capa mamilar (Gráfico 14).

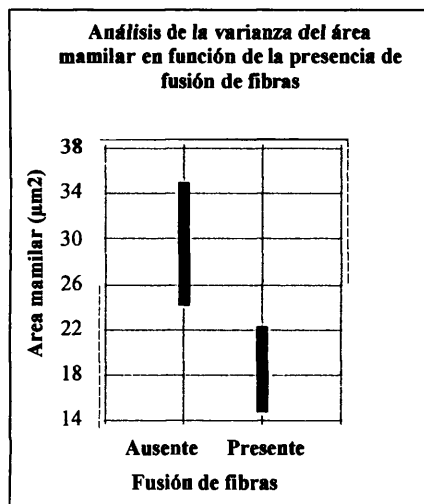


Gráfico 14: Análisis de la varianza del área mamilar en función de la presencia de fusión de fibras.

6. 2. Membrana interna

Cuantitativo

- *Diámetro de fibras.*

El diámetro medio de las fibras de la membrana interna, como ocurre en la membrana externa corresponde significativamente pero negativamente con el número de fibras. Esto implica que cuanto más gruesas menor es la densidad de las mismas.

Cuanto mayor es el diámetro de estas fibras mayor es el diámetro de las fibras de la membrana externa. Del mismo modo la densidad y distribución de estas fibras de la membrana externa se relacionan con los mismos parámetros en la membrana interna.

II. DETERMINACION DE LA VARIACIÓN EN LOS PARÁMETROS ESTABLECIDOS EN FUNCIÓN DE FACTORES GEOGRÁFICOS Y CLIMATOLÓGICOS, GENÉTICOS, E INMUNOLÓGICOS

II. 1. FACTORES GEOGRÁFICOS Y CLIMATOLÓGICOS.

II.1.1. Núcleo poblacional

En la variación del tamaño del huevo sobre la base de la longitud y ancho del mismo, no se encontraron diferencias significativas entre poblaciones para ninguna de las dos variables utilizando ANOVA de un factor. Lo mismo sucedió con la variable peso, si bien en este caso los resultados no son indicativos, impidiendo establecer cualquier conclusión válida para esta variable. Sin embargo, una de las muestras de la población Castellana si presento dimensiones significativamente inferiores a las otras poblaciones. En este caso se trato de un

huevo no eclosionado pero fértil, en el que se diagnosticó muerte embrionaria por infección bacteriana.

Las diferencias en el área de fisuras presentes entre mamilas resultaron estadísticamente no significativas entre las poblaciones de España y el Algarve portugués, mientras que este parámetro difirió de forma significativa entre estas poblaciones y la población del Duero en Portugal. El área de fisuras entre mamilas fue muy superior en el caso de la población del Duero situándose en una media de $12.185 \mu\text{m}^2$

El área mínima de vesículas a nivel de la capa de empalizada fue significativamente inferior en la población Castellano - Manchega en comparación con las poblaciones portuguesas entre las que no se apreciaron diferencias significativas (Figura F31 y F32). La comparación entre medias indica que el valor para esta área es aproximadamente la mitad en la población española. En relación con este dato, idéntica significación fue encontrada durante la valoración del número de vesículas presentes en las áreas de mayor densidad de la capa de empalizada.

La población española alcanzó niveles significativamente inferiores a las poblaciones portuguesas, en concreto la media de la población española se sitúa en 18.4 vesículas por unidad de superficie comparada mientras que las medias portuguesas se sitúan en 45.3 y 52.6 para las regiones del Algarve y Arribes del Duero respectivamente.

Continuando con el estudio de los parámetros de la capa de empalizada igualmente se encontraron diferencias altamente significativas ($p=0.02$), entre las poblaciones portuguesas y la española en cuanto al grosor y el área de dicha capa que resultó significativamente inferior en la población española, en concreto aproximadamente un 40% menor, mientras que los grosores de las poblaciones portuguesas fueron similares (Figuras F33 y F34).

La presencia de capa albugínea se constató mayormente en la población de Arribes de Duero, y un caso en la población castellana mientras que esta capa estuvo ausente en la población del Algarve portugués.

Durante el estudio detallado del número de poros presente en la superficie de la cáscara se hallaron diferencias significativas entre la población del Algarve y la Castellano - Manchega siendo en esta última menos numerosos (Figuras F27 y F28), mientras que las diferencias entre la población de los Arribes y las dos restantes no fueron significativas, figurando el número de poros de esta última dentro de un rango de valores mucho más amplio.

II. 2. 2. Altitud del área de cría

La máxima diferencia en relación con la altitud a la que se encuentran las plataformas de las parejas estudiadas fue de 900 m. Los resultados de los análisis estadísticos arrojan diferencias no significativas en ninguno de los parámetros estudiados, incluido el número de poros por unidad de superficie. Este último parámetro se ha descrito aumenta en aves que viven a gran altura.

II. 3. FACTORES GENETICOS E INDIVIDUALES

Se compararon los parámetros cuantitativos de huevos correspondientes a una misma pareja en años consecutivos. Los resultados indican que las magnitudes más variables en un mismo individuo son: El número de estratos, el ángulo de orientación de las columnas romboédricas, el área de intercambio gaseoso, el número de poros en superficie de la cáscara y los parámetros relativos a la membrana interna de la cáscara. Por el contrario determinadas variables permanecieron dentro de un rango estrecho: Los grosores de todas las capas excepto la de cristalización externa, y el área y distancia entre mamilas (Figura F13 y F14). Los estudios comparativos del número de poros en huevos de la

misma pareja en años consecutivos revelan un aumento significativo del número de poros.

En relación con los parámetros subjetivos, existe aun menor variación que en los cuantitativos. Los rasgos y estructuras características y anormales, como la existencia de fusión de fibras, o fenómenos de multinucleación permanecen invariables.

IL 4. FACTORES INMUNOLOGICOS E INFECCIOSOS

Alteraciones del estado inmunológico pueden dar lugar a una mayor predisposición al padecimiento de enfermedades, incluyendo aquellas que de alguna manera pueden afectar a la fertilidad. Ante la imposibilidad de comprobar el estado inmunológico de las aves salvajes de forma rigurosa, se procedió a la caracterización de las parejas en función de la presencia de patologías encontradas en la descendencia durante el chequeo sanitario en nido.

Entre las patologías encontradas en los pollos figuraron: Tricomoniasis, candidiasis, y salmonellosis. Todas ellas pueden teóricamente ser transmitidas de los padres a la descendencia, pudiendo ser los primeros portadores de la enfermedad o incluso padecerla.

Desafortunadamente no se ha podido acceder al chequeo de la descendencia de todas las parejas de las que se poseen restos de cáscara, y viceversa. No obstante, los resultados indican una superior incidencia de estas patologías en la población portuguesa del Algarve. Cuando se correlacionó la presencia o ausencia de patologías con determinadas características de la cáscara se obtuvieron los siguientes resultados.

En la población del Algarve, el 80% de las muestras procedentes de parejas en cuyos pollos se detectó algún tipo de patología, presentaron vesículas en la membrana externa. Sin embargo este porcentaje no fue significativo comparado con el observado en el total de la población (77%). De forma similar, ninguna de

las variables objetivas, tales como la densidad de fibras, o los fenómenos de fusión de fibras o multinucleación, se correlacionó con la presencia de estas enfermedades en la descendencia.

Los estudios de correlación entre la presencia de enfermedades y las variables cuantitativas, arrojaron resultados similares. Tan sólo el espesor medio de la membrana interna se correlaciono con la presencia de enfermedades. Los huevos procedentes de nidos con esta problemática mostraron espesores inferiores al resto.

III. DESCRIPCIÓN DE ALTERACIONES ULTRAESTRUCTURALES

Nos referiremos exclusivamente en este capítulo a las anomalías morfológicas relacionadas con aspectos objetivos de la ultraestructura de la cáscara. Las variaciones en los aspectos cuantitativos se han tratado con detalle en el capítulo I.

1. Cutícula

- *Presencia o ausencia de cutícula*

En cuatro (7.4%), de las muestras analizadas, se detectaron áreas muy reducidas de cutícula, apareciendo un gran desgaste de la superficie de la misma. Estos casos pueden ser el resultado del grado de exposición de esta capa a los agentes meteorológicos y la conservación de las muestras en el medio natural.

La cantidad de cutícula se ha correlacionado positivamente con la longitud el huevo. A mayor longitud mayor es la presencia de cutícula que se observa por unidad de superficie.

- *Presencia o ausencia esferolitos y vesículas*

Tan sólo en una de las muestras analizadas se detectó la presencia de esferolitos, muestra correspondiente a la zona de Almadén, provincia de Ciudad

Real. En este caso (Figura F52), la presencia de esferolitos se observó de forma adicional a otras anomalías afectando a la ultraestructura de la cáscara. No se observaron vesículas en ninguna de las muestras investigadas.

- *Presencia o no de material en la entrada de los poros.*

En cuatro (7.4%) de las muestras incluidas en el presente estudio, se detectó la presencia de partículas de morfología globular, superficie irregular y tamaño variable, situadas en la entrada de los poros (Figura F12). En uno de los casos se acompañó de la presencia de esferolitos, mientras que en otro se apreció la concurrencia de fracturas radiales a partir de los poros. En tres de los cuatro casos, se trató de huevos embrionados que murieron entre los días 8 y 25, sin que estas muertes embrionarias hayan podido atribuirse a causas infecciosas.

2. Capa de cristalización externa

- *Grado de cristalización*

En el 18.5% del total de muestras analizadas el grado de cristalización de esta capa fue bueno mientras que un 27.7% de las muestras presentaron cristalizaciones deficientes caracterizadas por una disminución de la estratificación acompañada de asimetría y desorganización que dieron una apariencia amorfa a esta capa. En el resto de los casos examinados, el grado de cristalización fue aceptable.

Deficiencias en el grado de cristalización de esta capa se correspondieron en todos los casos con reducciones notables en el grado de cristalización de la capa de empalizada. Las alteraciones en la cristalización de esta capa dan lugar a la aparición de canales irregulares con alteración de su trayectoria rectilínea habitual a nivel de la capa de cristalización externa. El grado de uniformidad y definición de estos poros parece pues depender en parte de este concepto.

3. Capa de empalizada

- *Grado de cristalización*

Se ha constado el deterioro en el grado de cristalización de esta capa que parece afectar desigualmente a las distintas poblaciones. Así, en la población del Algarve, un 17.25% del total de muestras presentaron grados deficientes de cristalización, mientras que dicho porcentaje se redujo hasta 12.5% y 6.2% en las poblaciones de El Duero y Castilla - La Mancha respectivamente. Las anomalías consisten en la pérdida de homogeneidad y cambios en la orientación afectando a las formaciones romboédricas. En los casos más severos los cristales se vuelven amorfos y su orientación ciertamente variable. La densidad de formas romboédricas disminuye notablemente dejando paso a áreas planas, carentes de estratificación, pero de aspecto homogéneo, similar a las encontradas en otros grupos de aves como las Galliformes.

4. Capa mamilar

- *Grado de multinucleación*

Se trata de una anomalía presente en el 25.9% de las muestras analizadas, lo que supone un porcentaje ciertamente elevado. El grado de multinucleación observado fue muy similar en todas las muestras en las que estuvo presente, siendo de grado leve implicando entre un tres y un seis por ciento de los conos mamilares. No se observó una relación constante entre la aparición de este fenómeno y alteraciones severas en el grado de cristalización. Sin embargo, en un 64.2% de los casos se acompañó de una distribución irregular de los conos mamilares. En la población del Algarve este fenómeno se presentó en el 31% de las muestras correspondientes a esa área mientras que en las poblaciones del Duero y Castilla - La Mancha los porcentajes disminuyeron al 12.5 % y 18.7% respectivamente.

- *Forma, tamaño y distribución de las mamilas.*

La aparición de formas aberrantes en la superficie de contacto con las membranas va ligada a fenómenos de multinucleación. En estos las mamilas

afectadas aumentan notablemente su tamaño al tiempo que su forma se desvirtúa, apareciendo mamelones como resultado de la incorporación de varios núcleos. El tamaño es ciertamente variable en condiciones fisiológicas, sin embargo, un aumento generalizado del tamaño de las mamilas en ausencia de multinucleación se ha asociado en este estudio a infertilidad y fragilidad de la cáscara (Figura F51). Tan sólo se han detectado dos casos en los que se acompañó de distribución muy irregular de las mamilas, con la apertura de grandes espacios entre las mismas y la presencia de grietas intermamilares. En ambos casos la forma al corte de la mamila fue plana. No obstante, según se desprende de los datos del presente estudio las formas prominentes aparecen tanto en huevos fértiles como infértiles, de modo que no puede asociarse a ninguno de estos estados. Las formas planas se registraron exclusivamente en huevos fértiles (Figura F42), en el presente estudio, si bien es posible que la muestra en este caso no haya sido suficientemente grande.

- *Conexión con membranas testáceas.*

El 70% de los huevos examinados que mostraron una buena adherencia entre los conos mamilares y la membrana externa fueron huevos infértiles, mientras que el resto fueron fértiles. En todos estos casos la distribución de los conos mamilares fue irregular.

5. Membranas testáceas

5.1. Membrana externa

- *Distribución y morfología de las fibras*

En el 50% de las muestras examinadas se apreció una distribución irregular de las fibras. Este fenómeno no se relacionó de forma constante con la presencia de vesículas o con fusión de las fibras (Figura F49). En el 95% de la población de El Algarve aparecen vesículas de tamaño variable adheridas a la superficie de las fibras (figura F47 y F47a). En el 45% de estos casos, las vesículas fueron de un tamaño entre 4 y 6 veces superior al habitual y su número se multiplicó por 10 en los casos más extremos. En estas muestras se apreció la presencia de vesículas

invadiendo la capa de empalizada (Figura F48) e incluso la capa de cristalización externa.

El presente estudio demuestra que la presencia de un mayor número y tamaño de estas vesículas, esta relacionada con la aparición de una capa entre la capa de empalizada y la de los conos mamilares, y cuyas características se han descrito en las anomalías de las capas de cristalización. La aparición de estas vesículas, no parece estar relacionado con la distribución regular o irregular de las fibras en el águila perdicera.

La presencia de formaciones globulares en dicha capa se correlaciona significativamente pero negativamente con la distribución de las fibras en esta membrana. Cuanto mayor es el numero de formaciones globulares mayor es la irregularidad en la distribución de estas fibras. La correlación es significativa ($p=0.04$) y los estudios acerca de la idoneidad del modelo lineal establecido indican que es correcto.

La presencia de estas formaciones se ha relacionado también con la cantidad de cutícula, así las vesículas tienden a presentarse cuando la cantidad de cutícula es muy reducida. Esta correlación es muy significativa ($p=0.01$) cuando se incluye una población de datos correspondientes a aquellos huevos en los que se sabe ha ocurrido muerte embrionaria, y los estudios estadísticos indican que el modelo lineal elegido es correcto. Los resultados indican que la presencia de estas estructuras globulares se asocia con áreas de nucleación reducidas y un aumento en la densidad de las fibras de la membrana externa (Gráfico 15).

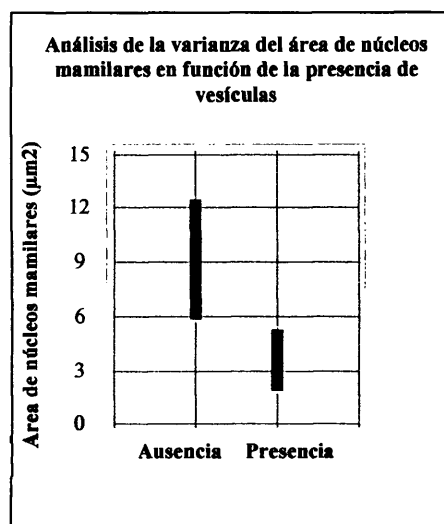


Gráfico 15: Análisis de la varianza del área de núcleos mamilares en función de la presencia de vesículas.

Los fenómenos de fusión de fibras afectando a estas membranas se correlacionan significativamente con un mayor grado de cristalización de la capa externa.

5.2 Membrana interna

- *Distribución de fibras*

Las distribuciones irregulares afectando a la membrana interna son ciertamente poco frecuentes en esta especie. Cuando aparecen el grado de irregularidad es siempre inferior al observado en la membrana externa, si bien siempre aparece en conjunción con esta. Del mismo modo los aumentos citados en el número de vesículas y su tamaño detectados en la membrana externa ocurren de forma sincrónica en la interna. En los casos más extremos, siempre se observa la presencia de fibras fusionadas en partes importantes de su trayectoria, por lo que dichos fenómenos parecen ir de alguna forma asociados.

IV. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE TÓXICOS AMBIENTALES EN CONTENIDOS DE HUEVOS COMO BIOINDICADORES

IV. 1. TAMAÑO DE LA MUESTRA ANALIZADA

Se analizaron los contenidos correspondientes a un total de 32 huevos, de los cuales 24 correspondieron a la población del Algarve, 2 a la del Duero y el resto a la población Castellano - Manchega. No se llevo a cabo ninguna selección de la muestra procediendo a analizarse todas las muestras recabadas. Para una mejor exposición de los resultados se ha procedido a una separación de los mismos por grupos de tóxicos: organoclorados, bifenilos policlorados y mercurio.

IV. 2. ANÁLISIS TOXICOLÓGICO

Para una mejor comprensión de los datos se ha procedido a expresar los niveles de cada tóxico en función de materia húmeda, materia seca y fracción lipídica. En cada tabla figuran las unidades en las que se expresan los resultados. En la siguiente tabla se ha compilado la información correspondiente a los principales compuestos, para los que se han encontrado niveles apreciables según los rangos de detección de las técnicas empleadas. Los resultados se expresan para cada población como media, desviación estándar, valor máximo, valor mínimo, y número de muestras analizadas.

La presente tabla es un resumen de la información obtenida. El grueso de los resultados se detallan en cada sección según grupos de tóxicos.

IV. 2.1. Organoclorados

Se han analizado los siguientes residuos de organoclorados: HCB, α -HCH, γ -HCH, p,p-DDE, HEOD, p,p-TDE, y p,p-DDT. Los resultados obtenidos figuran en la tabla 21.

- *Formas activas: Hexaclorobenceno (HCB), α -HCH, γ -HCH y p , p -DDT.*

Con la técnica de detección utilizada en este estudio, en el caso de las formas activas, no se detectaron niveles en un gran número de muestras. No se encontraron residuos de DDT, en ninguna de las muestras analizadas. Algo similar ocurrió con el α -HCH y γ -HCH en el que tan sólo se detectaron niveles en cuatro y tres del total de 32 muestras examinadas. Los niveles de este α -HCH, se mantuvieron entre 0.006 y 0.014 $\mu\text{g/g}$.

- *Metabolitos: Dieldrín (HEOD), p , p -TDE, y p , p -DDE.*

Los resultados figuran en la Tabla 21. Los niveles mas elevados de residuos se encontraron en el DDE, situándose entre 0.16 y 2.9 $\mu\text{g/g}$ de materia húmeda en las poblaciones objeto de estudio.

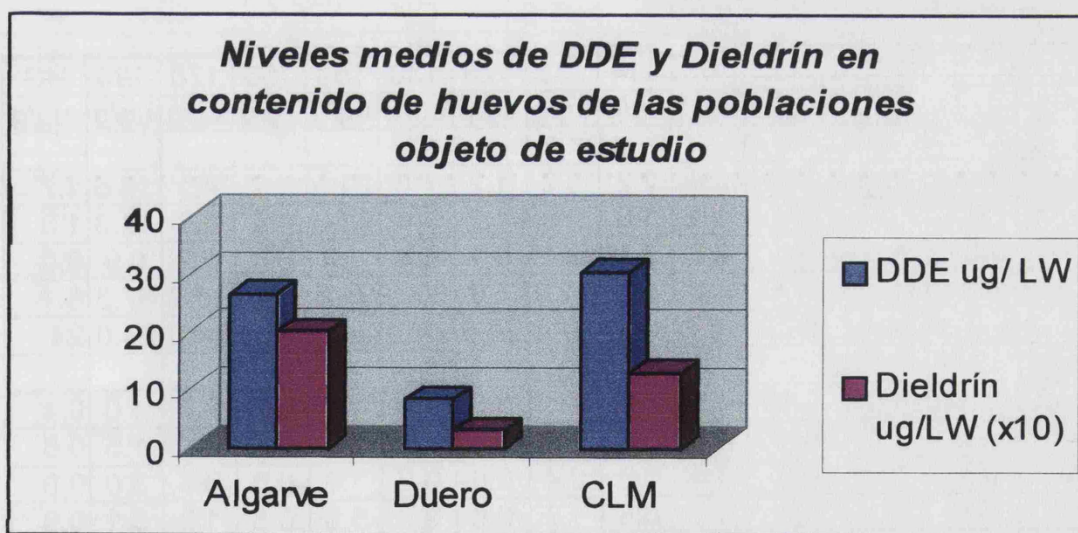


Gráfico 16: Niveles medios de DDE y dieldrín en contenido de huevos de.

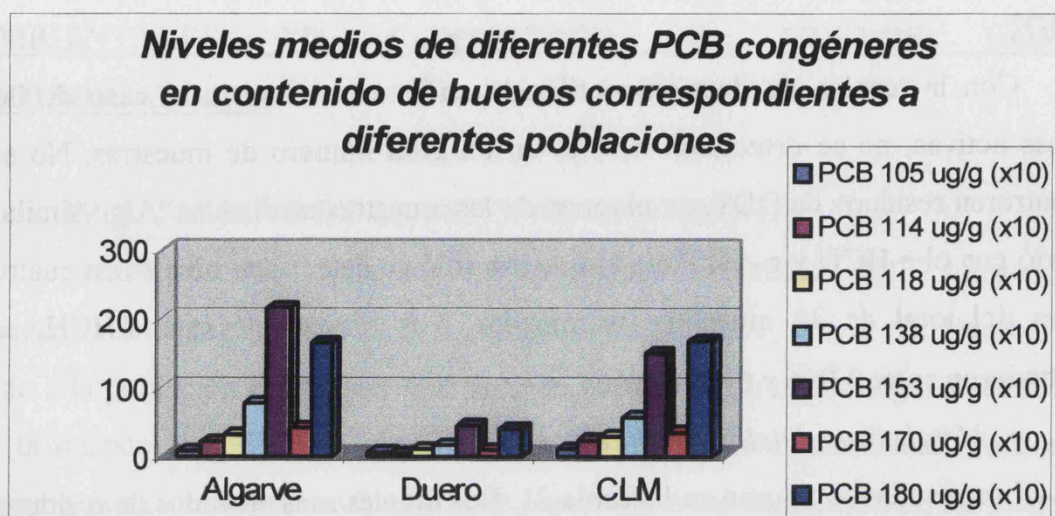


Gráfico 17: Niveles medios de los diferentes congéneres de PCBs en

Tabla 20: Resumen de los niveles de tóxicos en contenidos de huevos correspondientes a las tres poblaciones objeto de estudio. Los resultados se expresan en $\mu\text{g/g}$ de materia grasa.

		DDE	HEOD	105	114	118	128	138	153	156	170	180	HG
		ug/g	ug/g	ug/g	ug/g	ug/g	ug/g	ug/g	ug/g	ug/g	ug/g	ug/g	ug/g
Algarve	Mean	26.5	2.0	0.8	2.2	3.2	1.2	7.8	21.5	1.7	4.1	16.5	1.7
	SD	22.7	2.8	1.0	1.8	2.8	1.2	7.4	21.0	1.2	3.8	13.8	1.8
	Min	4.0	0.0	0.0	0.1	0.1	0.1	0.1	1.0	0.1	0.2	0.9	0.0
	Max	92.2	11.6	4.2	5.6	11.9	5.6	30.9	91.6	3.7	16.2	57.3	6.1
	n	24.0	24.0	19.0	19.0	24.0	24.0	24.0	24.0	19.0	24.0	24.0	24
Duero	Mean	8.4	0.3	0.6	0.4	1.1	0.3	1.6	4.5	0.7	0.9	4.0	0.4
	SD	2.5	0.4	0.3	0.6	0.9	0.4	1.0	2.0	0.2	0.4	1.5	0.6
	Min	6.6	0.0	0.4	0.0	0.4	0.0	0.9	3.0	0.5	0.7	3.0	0.0
	Max	10.1	0.5	0.9	0.8	1.7	0.6	2.3	5.9	0.8	1.2	5.1	0.9
	n	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0
CCLM	Mean	30.3	1.3	1.1	2.4	2.9	0.9	5.7	15.0	2.3	3.5	16.8	3.7
	SD	13.6	1.6	1.1	1.6	3.2	1.0	5.6	10.5	1.3	2.0	8.4	3.9
	Min	16.8	0.4	0.0	0.5	0.0	0.0	0.6	4.0	0.9	1.2	7.0	0.0
	Max	49.2	3.7	2.3	3.6	6.0	1.8	11.2	26.9	3.1	5.5	25.6	7.6
	n	4.0	4.0	3.0	3.0	4.0	4.0	4.0	4.0	3.0	4.0	4.0	4.0

Tabla 21: Niveles de residuos de organoclorados en contenidos de huevos de águila perdicera expresados en $\mu\text{g/g}$ de materia húmeda.

MUESTR A	HCB	A-HCH	G-HCH	P, P-DDE	HEOD	P, P- TDE	P, P-DDT
	($\mu\text{g/g}$)	($\mu\text{g/g}$)	($\mu\text{g/g}$)	($\mu\text{g/g}$)	($\mu\text{g/g}$)	($\mu\text{g/g}$)	($\mu\text{g/g}$)
1	ND	ND	ND	0.336	0.026	ND	ND
2	ND	ND	ND	0.93	0.097	0.009	ND
3	ND	ND	ND	0.22	0.015	ND	ND
4	ND	0.013	ND	0.348	0.027	ND	ND
5	0.008	ND	ND	1.771	0.604	ND	ND
6	0.013	ND	0.014	0.564	0.056	0.021	ND
7	ND	0.014	ND	0.21	0.014	0.017	ND
8	0.011	ND	ND	1.301	0.026	0.021	ND
9	0.02	ND	ND	2.026	0.04	0.082	ND
10	ND	ND	ND	2.969	0.048	0.018	ND
11	ND	ND	ND	0.166	0.012	ND	ND
12	ND	ND	ND	0.203	0.021	ND	ND
13	ND	ND	ND	0.8	0.026	ND	ND
14	ND	0.007	ND	0.784	0.034	ND	ND
15	ND	ND	ND	0.845	0.053	ND	ND
16	0.008	ND	0.024	0.766	0.051	0.02	ND
17	ND	ND	ND	0.639	0.041	ND	ND
18	0.009	0.006	0.003	1.736	0.118	0.007	ND
19	ND	ND	ND	0.441	0.01	ND	ND
20	ND	ND	ND	0.504	0.023	ND	ND
21	0.015	ND	ND	0.768	0.036	ND	ND
22	ND	ND	ND	0.387	0.014	ND	ND
23	ND	ND	ND	0.196	ND	ND	ND
24	ND	ND	ND	0.799	0.021	ND	ND
25	ND	ND	ND	0.522	ND	ND	ND
26	0.017	ND	ND	1.964	0.16	ND	ND
27	ND	ND	ND	1.01	0.03	ND	ND
28	ND	ND	ND	0.182	0.021	ND	ND
29	ND	ND	ND	1.161	0.067	ND	ND
30	0.022	ND	ND	0.973	0.049	ND	ND
31	0.018	ND	ND	1.973	0.193	ND	ND
32	ND	0.047	ND	1.18	0.09	ND	ND

Tablas 22 y 23: Concentraciones de diferentes congéneres de PCBs expresadas en $\mu\text{g/g}$ de materia húmeda.

N REF	8	18	29	28	31	52	77	101	105	114	118	123
	$\mu\text{g/g}$	$\mu\text{g/g}$	$\mu\text{g/g}$	$\mu\text{g/g}$	$\mu\text{g/g}$	$\mu\text{g/g}$	$\mu\text{g/g}$	$\mu\text{g/g}$	$\mu\text{g/g}$	$\mu\text{g/g}$	$\mu\text{g/g}$	$\mu\text{g/g}$
1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.021	0.032	0.006
2	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.154	0.149	0.193	0.017
3	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.008	0.007	ND
4	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.045	0.041	0.087	0.044
5	ND	ND	ND	ND	0.116	ND	ND	0.008	0.087	0.292	0.399	0.044
6	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.045	0.073	ND
7	0.093	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.005	0.015	0.038	ND
8	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.007	0.052	0.14	0.249	ND
9	ND	ND	ND	ND	0.041	ND	ND	0.021	0.167	0.265	0.434	0.07
10	ND	ND	ND	ND	0.009	ND	ND	ND	0.014	0.041	0.049	ND
11	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.014	0.005	ND
12	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.011	0.009	0.036	ND
13	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.069	0.042	0.064	ND
114	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.01	0.041	0.052	0.007
15	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.035	0.161	0.206	0.02
16	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.034	0.192	0.235	ND
17	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.014	0.05	0.044	ND
18	ND	ND	0.005	ND	ND	ND	ND	ND	0.068	0.246	0.319	ND
19	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.007	0.018	0.026	0.007
20	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.025	0.119	0.116	ND
21	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.029	0.16	0.192	0.017
22	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.066	0.1	0.092	ND
23	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.008	ND	0.009	ND
24	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.026	0.015	ND
25	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.012	0.021	0.015	ND
26	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.079	0.317	0.404	ND
27	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND			0.034	
28	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND			0.017	
29	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND			0.052	
30	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND			0.138	
31	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND			0.257	
32	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND			ND	

N REF	126	128	138	149	153	156	157	167	169	170	180	189	209
	ug/g	Ug/g	ug/g	ug/g	ug/g	ug/g	ug/g	ug/g	ug/g	ug/g	ug/g	ug/g	ug/g
1	ND	0.009	0.084	ND	0.227	0.025	ND	ND	ND	0.037	0.217	ND	ND
2	0.009	0.071	0.523	0.012	1.176	0.117	0.012	0.041	0.005	0.218	0.876	0.022	0.007
3	ND	0.012	0.006	ND	0.055	0.008	ND	ND	ND	0.009	0.05	ND	ND
4	ND	0.029	0.122	ND	0.31	0.042	ND	0.012	0.07	0.063	0.269	ND	0.057
5	0.123	0.144	0.927	0.058	2.039	0.189	0.017	0.073	ND	0.344	1.367	0.028	0.01
6	ND	0.008	0.085	ND	0.372	0.049	ND	0.014	ND	0.065	0.349	ND	ND
7	ND	ND	0.011	ND	0.069	0.013	ND	ND	ND	0.025	0.077	ND	ND
8	ND	0.084	0.469	0.011	0.978	0.141	0.012	0.052	ND	0.227	1.034	0.02	0.098
9	0.007	0.13	0.816	0.034	1.954	0.226	0.013	0.077	ND	0.398	1.86	0.031	0.023
10	ND	0.024	0.111	ND	0.296	0.032	0.01	0.01	ND	0.064	0.244	ND	ND
11	ND	0.007	0.01	ND	0.047	0.011	ND	ND	ND	0.019	0.082	ND	ND
12	ND	0.014	0.028	ND	0.081	0.01	ND	0.01	ND	0.015	0.066	ND	ND
13	ND	0.024	0.128	ND	0.346	0.044	ND	0.01	0.009	0.072	0.332	ND	0.027
14	ND	0.02	0.124	ND	0.32	0.034	ND	0.014	ND	0.065	0.258	ND	ND
15	0.029	0.055	0.454	ND	1.057	0.114	ND	0.038	ND	0.197	0.827	0.025	ND
16	ND	0.056	0.475	ND	1.32	0.144	0.008	0.038	ND	0.262	1.216	0.024	ND
17	ND	0.029	0.092	ND	0.286	0.039	ND	ND	ND	0.06	0.264	ND	ND
18	0.015	0.113	0.772	0.054	1.707	0.167	0.015	0.062	0.005	0.302	1.256	0.022	0.018
19	ND	0.011	0.032	ND	0.138	0.016	ND	ND	ND	0.026	0.133	ND	ND
20	ND	0.047	0.282	ND	0.749	0.089	ND	0.024	ND	0.166	0.769	ND	ND
21	0.016	0.056	0.459	ND	1.116	0.134	0.014	0.038	ND	0.241	1.08	0.025	ND
22	ND	0.045	0.223	ND	0.627	0.077	ND	0.028	ND	0.138	0.624	ND	ND
23	ND	ND	0.017	ND	0.059	0.011	ND	ND	ND	0.013	0.058	ND	ND
24	ND	ND	0.03	ND	0.188	0.04	ND	ND	ND	0.055	0.334	ND	ND
25	ND	0.015	0.04	ND	0.142	0.021	ND	ND	ND	0.031	0.172	ND	ND
26	0.093	0.125	0.904	0.037	2.016	0.217	0.019	0.076	ND	0.364	1.471	0.036	ND
27	ND	0.011	0.084	ND	0.302				ND				
28	ND	0.009	0.063	ND	0.2				ND				
29	ND	0.017	0.139	ND	0.48				ND				
30	ND	0.054	0.37	ND	1.323				ND				
31	0.051	0.12	0.662	0.05	1.962				ND				
32	ND	ND	0.033	ND	0.213				ND				

En el caso del Dieldrin los niveles se situaron entre niveles por debajo de los límites de detección y 0.604 $\mu\text{g/g}$. En el caso del TDE, tan sólo se detectaron niveles en ocho del total de 32 muestras examinadas variando entre 0.007 y 0.08 $\mu\text{g/g}$ de materia húmeda.

IV.2.2 Estudio de los niveles de bifenilos policlorados

Se estudiaron un total de 25 congéneres distintos: 8, 18, 29, 28, 31, 52, 77, 101, 105, 114, 118, 123, 126, 128, 138, 149, 153, 156, 157, 167, 169, 170, 180, 189, 209. Los resultados, expresados en $\mu\text{g/g}$ de materia húmeda, figuran en las tablas correspondientes.

IV.2.3 Estudio de los niveles de mercurio

Se determinó exclusivamente mercurio por las razones expuestas en el apartado de material y métodos. Los niveles variaron entre la ausencia de niveles detectables y $7.6 \mu\text{g/g}$ de materia seca. Los datos generales figuran en la siguiente Tabla 24. Se han detectado niveles considerables de este metal en muestras concretas procedentes de la población de Castilla - La Mancha. No se evaluó la presencia de metales y otros compuestos en función de los cuales la toxicidad del mercurio puede variar. Tampoco se analizó la cantidad que realmente corresponde a metilmercurio, el más tóxico de los mercuriales conocido, en función de la cual varía el grado final de toxicidad.



Gráfico 18: Niveles medios de mercurio en contenido de huevos de las diferentes poblaciones estudiadas.

los niveles considerados como causantes de alteraciones embrionarias (Gráfico 18), en otras especies de rapaces.

Tabla 24: Niveles de mercurio presentes en las muestras analizadas.

MUESTRA	CONCENTRACION en el total Digerido (ug)	CONCENTRACION como materia húmeda (ug/g)	CONCENTRACION como materia seca (ug/g)
1	0.254	0.218	1.394
2	0.957	0.587	2.666
3	ND	ND	ND
4	ND	ND	ND
5	1.812	1.105	5.66
6	0.533	0.311	1.176
7	ND	ND	ND
8	2.72	1.742	7.599
9	1.345	1.632	6.524
10	0.592	0.36	2.166
11	ND	ND	ND
12	0.204	0.181	0.958
13	0.116	0.144	0.811
14	0.093	0.11	0.641
15	0.23	0.457	3.159
16	ND	ND	ND
17	0.692	0.733	4.303
18	1.189	0.651	3.616
19	ND	ND	ND
20	ND	ND	ND
21	0.169	0.154	0.921
22	0.101	0.07	0.42
23	0.143	0.11	0.871
24	0.107	0.145	0.705
25	0.08	0.091	0.429
26	1.195	1.27	6.101
27	ND	ND	ND
28	0.173	0.189	1.33
29	0.372	0.298	1.76
30	0.021	0.044	0.25
31	0.361	0.343	1.91
32	0.035	0.044	0.21

IV.3. ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE POBLACIONES

Se procedió al estudio comparativo de los niveles de tres principales grupos de tóxicos mediante ANOVA de una vía. Los resultados son de especial relevancia, ya que dan una visión general de las diferencias ecotoxicológicas, de los diferentes hábitats y localizaciones geográficas. En relación con los contenidos en DDE, los resultados indican que no existen diferencias significativas entre poblaciones en un nivel de confianza del 95%. Sin embargo, los niveles de este compuesto son claramente superiores en la población Castellano - Manchega observándose una tendencia a la significación ($p=0.17$). Las diferencias en los niveles de dieldrin entre las diferentes poblaciones no fueron significativas si bien se observaron niveles superiores en la población Castellano - Manchega. No se realizaron los análisis estadísticos correspondientes al resto de los compuestos organoclorados, debido a la alta incidencia de muestras en las que no se detectaron.

No se apreciaron diferencias significativas entre poblaciones, en los niveles de cada uno de los congéneres de PCBs analizados en este estudio. No obstante, para todos los compuestos examinados, los niveles fueron superiores en el caso de la población española. Estudiados los niveles de PCBs de forma conjunta, tampoco se observaron diferencias significativas entre poblaciones.

Los niveles de mercurio en contenido de huevos fueron significativamente superiores en la población Castellano - Manchega ($p=0.05$) con respecto a cada una de las poblaciones portuguesas.

IV.4. RELACIÓN DE LOS NIVELES DE TÓXICOS ENTRE SÍ Y CON LOS PARÁMETROS ULTRAESTRUCTURALES DE LA CÁSCARA.

Se analizaron, en primer lugar, las correlaciones entre diferentes grupos de tóxicos utilizando los resultados referidos a materia lipídica. Se apreciaron correlaciones positivas aunque no significativas entre los niveles de DDE y un gran número de congéneres de PCBs incluyendo: 114, 105, 118, 128, 138, 153, 170, 156, y 180. En el caso de los dos últimos se observaron tendencias importantes hacia la significación ($p=0.10$). Se puso de manifiesto una cierta tendencia ($p=0.10$) positiva entre los niveles de DDE y mercurio.

Las cantidades de mercurio se relacionaron positiva y significativamente con los niveles de los siguientes congéneres de PCBs: 114, 118, 128, 138, 153, 156, 170, 180. En todos estos casos los niveles de significación fueron muy altos oscilando entre 0.00 y 0.02. Las proporciones de Dieldrin se correlacionan positiva y significativamente con los niveles del contenido total en PCBs, entendido como suma del total de los congéneres analizados.

Los niveles de DDE se correlacionaron positiva y significativamente ($p=0.03$) con el área de fisuras entre mamilas (Figura F18). Especialmente interesante fue la correlación negativa existente entre el contenido en DDE y la fertilidad. Contenidos elevados de DDE se correlacionaron ($p=0.03$) con huevos infértiles. El mismo nivel de significación se obtuvo en la correlación entre los niveles de DDE y la presencia de fusión de fibras (Figura F17 y F17a).

Niveles elevados de DDE se correlacionaron con números elevados de vesículas y mamilas si bien esta correlación no fue significativa. Del mismo modo, el aumento de los niveles de DDE tendió a cursar con un descenso en el número de poros. No obstante, estas tendencias no fueron estadísticamente significativas. En el presente estudio, aumentos en los niveles de DDE no se correlacionaron con disminuciones significativas del grosor total de la cáscara.

Los niveles de dieldrin se relacionaron positiva y significativamente con el área de fisuras entre mamilas, y el área de los centros de nucleación. Niveles altos de dieldrin se correlacionaron significativamente con distribuciones irregulares de las mamilas (Figura F20).

Contenidos elevados de PCBs cursaron con distribuciones irregulares de las fibras de la membrana externa de la cáscara, siendo esta correlación significativa. No se observaron relaciones significativas con otros parámetros. En general, el grosor total de la cáscara aumentó con el aumento de los niveles de PCBs si bien esta tendencia no fue significativa.

La relación entre los niveles de mercurio y los diferentes parámetros cuantitativos y cualitativos de la cáscara resultó particularmente interesante. A niveles mayores de mercurio le correspondieron aumentos significativos en el área delimitada por los poros. En relación con este extremo también aumentaron significativamente el número de poros y canales en la cáscara (Figura F19). De forma idéntica a lo expresado para los PCBs, a mayores niveles de mercurio, mayor irregularidad en la distribución de las fibras de la membrana externa (Figura F22). El aumento del contenido en mercurio se tradujo en una disminución muy significativa del número de fibras de la membrana interna de la cáscara. El aumento de los niveles de mercurio da lugar a una tendencia a la disminución del área mamilar así como del número de vesículas.

V. DOCUMENTACIÓN DE ESTADÍOS EMBRIONARIOS Y RELACIÓN CON PARÁMETROS ULTRAESTRUCTURALES

V.1. TAMAÑO Y CARACTERÍSTICAS DE LA MUESTRA

De un total de veinticinco huevos intactos analizados, 17 resultaron fértiles conteniendo embriones correspondientes a las siguientes edades: 5, 7, 8, 9, 15, 25,

28, 35, 36, 37 y 39 días. Tras el examen post-mortem, en cuatro de ellos se detectaron anomalías que los invalidan para formar parte de los valores de referencia. Debido a la imposibilidad de acceder a los nidos con mayor prontitud para evitar molestias a las aves, muchas de las muestras se encontraron en avanzado estado de descomposición con la consiguiente autólisis, por lo que no pudieron realizarse estudios histopatológicos.

En el caso de un embrión de 28 días se apreció engrosamiento del pericardio acompañado de braquignatia y acortamiento significativo asimétrico de extremidades (Figura F61). En un segundo caso se observaron petequias y hemorragias generalizadas en un embrión de 36 días, mientras que en un embrión de similar edad se observó serositis y edema subcutáneo (Figura F62). Por último, en el cuarto de los embriones afectados, con una edad de 34 días, se apreció caquecisia y palidez.

V.2. CARACTERÍSTICAS DE LOS DIFERENTES ESTADÍOS EMBRIONARIOS

Eliminados aquellos embriones en función de las premisas establecidas en el apartado: Material y Métodos, tras la toma de medidas correspondientes, de los embriones clasificados por edades, y los valores para las magnitudes referencia se exponen en la siguiente tabla:

Tabla 25: Valores de referencia para diferentes parámetros embrionarios en función de la edad del embrión.

EDAD	PESO	LONGITUD	ANCHO	ANTEBRAZO	TARSO	BASE	ANEJOS	OJO	MICROBIOLOGIA
5	0.98	1.12	0.7				11.3		
7	1.57	1.43	0.87					0.3	<i>E. coli</i>
8	1.79	2.14	1.32	0.22	0.15	0.91	2.44	0.3	<i>E. coli</i>
9	0.74	2.6	0.65	0.26	0.17	0.89		0.4	<i>Prot spp</i>
15	1.55	3.32	0.96	0.68	0.4	1.2	7.68	0.8	<i>E. coli, Prot spp</i>
25	9.36	6.6	2	1.68	1.17	1.52		0.8	<i>E. coli, Pseud spp</i>
28-30	14.43	6.7	2	1.65	1.33	1.5		0.6	<i>Pseud spp</i>
33	42.82	11.05	2.96	2.5	2.08	1.17	9.49	0.7	<i>E. coli</i>
35	49.25	10.66	2.8	2.54	2.09	1	11.63	0.7	<i>E. coli</i>
38	46.03	10.13	2.68	2.42	1.95	2	7.72	0.7	<i>E. coli, Prot sp</i>

Descripción de los diferentes estadios:

- *Cinco días:*

El embrión de águila perdicera de cinco días se ajusta a los estadios 13 de la clasificación de Carnegie y 17 a 18 de la clasificación de Hamburger y Hamilton. En este estadio del desarrollo se aprecian ya un esbozo de los botones craneal y caudal que corresponderán más tarde a los miembros (Figura F53). Bajo la lupa binocular se observa el otocisto. En el presente estudio fue difícil distinguir el número exacto de somitos debido al estado de conservación de los embriones. La longitud del embrión en este estadio es aproximadamente de 1.12 cm.

- *Siete días:*

El desarrollo observado en embriones de siete y ocho días se corresponde con los estadios 16 de Carnegie y 23 a 24 de Hamburger y Hamilton. Los mamelones correspondientes a los miembros aparecen algo mas destacados y el proceso maxilar comienza a alargarse superando en longitud a los procesos lateral y medial mandibulares que tienden a fusionarse con el anterior (Figura F54). Si bien los cortes histopatológicos, son simplemente indicativos debido al grado de autólisis, se ha podido detectar la presencia de bazo y adrenales, así como, la separación entre esófago y tráquea como aspectos de referencia. También aparecen pequeñas bandas de tejido muscular alrededor del ojo.

- *Ocho y nueve días:*

El desarrollo observado corresponde con los estadios 19 de Carnegie y 29 y 30 de Hamburger y Hamilton. Las extremidades inferiores aparecen destacadas y más largas que las alas, en ambos miembros aparecen demarcaciones digitales pero mucho menos claras que en el pollo. El pico comienza a hacerse prominente y aparece el diamante (Figura F55). Los párpados se hacen visibles y las narinas aparecen aún cerradas. El cuello se alarga considerablemente. Al contrario de lo estimado para el pollo no aparecen todavía esbozos de las plumas localizados en la espalda del embrión. Los embriones en este estadio aumentan notablemente su longitud debido a la elongación del cuello superando los dos centímetros. Las alas pasan a ser medibles alcanzando entre dos y tres milímetros de longitud. Entre los once y doce días estos rasgos se acentúan, aumenta la prominencia de la maxila y se estructuran los párpados (Figura F56).

- *Quince días:*

El desarrollo observado corresponde al estadio 23 de Carnegie, estadio 36 de Hamburger y Hamilton. Los párpados comienzan a cerrarse mientras el pico se hace prominente (Figura F57) y los dedos aparecen bien diferenciados. Comienzan a aparecer algunos esbozos de folículos fundamentalmente en las porciones caudales del embrión. El crecimiento en longitud en esta fase no es espectacular,

pero si el alargamiento de los miembros en esta fase del desarrollo embrionario donde las alas llegan a duplicar la longitud registrada en el estadio 19.

- *Veinticinco días:*

En este estadio el embrión multiplica por cuatro su peso y duplica su longitud, alcanzando los 6.6 cm de longitud. El crecimiento en esta fase es progresivo y el embrión vuelve a triplicar la longitud de sus extremidades. Continúa también la misma progresión en el crecimiento del pico en longitud medida desde su base.

- *Veintiocho a veintinueve días:*

En este estadio el embrión del águila perdicera parece aumentar en peso con respecto a estadios anteriores (Figura F58), mientras que su crecimiento en longitud no experimenta los incrementos notables registrados en estadios anteriores. El peso se sitúa entorno a los 14 g mientras que la longitud del embrión es de 6.7 cm. Curiosamente el diámetro ocular no varía notablemente en comparación con el registrado en estadios más avanzados del desarrollo embrionario.

- *Treinta y tres a treinta y cinco días:*

Entre los 28 y los 33 días el embrión experimenta un crecimiento muy rápido que se traduce de nuevo en un peso tres veces superior al registrado a los 28 días. Este se acompaña de un aumento en longitud tanto del embrión en su totalidad como de los miembros que casi llegan a duplicar la registrada para embriones de 28 días. En estos estadios el embrión esta totalmente formado pero aparecen aun cantidades importantes de vitelo por reabsorber. La longitud del pico desde su base no experimenta variación alguna, al igual que sucede con la cabeza y el ojo. Las estructuras del cráneo aparecen ya bien osificadas (Figura F59).

- *Treinta y ocho días:*

En este estadio el embrión esta completamente formado y a punto de eclosionar. En estos últimos estadios no experimenta cambios notables, salvo el consumo y reabsorción del vitelo, y el sensible aumento de las excretas. Los

párpados aparecen perfectamente formados y cerrados (Figura F60). El embrión adopta la posición fetal típica en la que la cabeza aparece posicionada bajo el ala derecha y el diamante contactando con la membrana interna a nivel de la cámara de aire. El ombligo aparece cerrado y el desarrollo de las plumas es manifiesto, si bien se han apreciado variaciones individuales en este aspecto.

V.3. CORRELACIÓN ENTRE PARÁMETROS DE DESARROLLO

De lo expuesto anteriormente se deduce que el desarrollo embrionario en esta especie presenta diferentes fases caracterizadas por diferencias en el ritmo y características del crecimiento. En este sentido resulta interesante correlacionar los cambios que experimentan los diferentes parámetros, de modo que los posibles cambios en el desarrollo embrionario debidos a factores externos puedan relacionarse con alteraciones en determinadas fases embrionarias, o incluso con afección en alguno de los parámetros estudiados. Por esta razón seguidamente se reflejan en gráficas la correlación entre estos parámetros en esta especie.

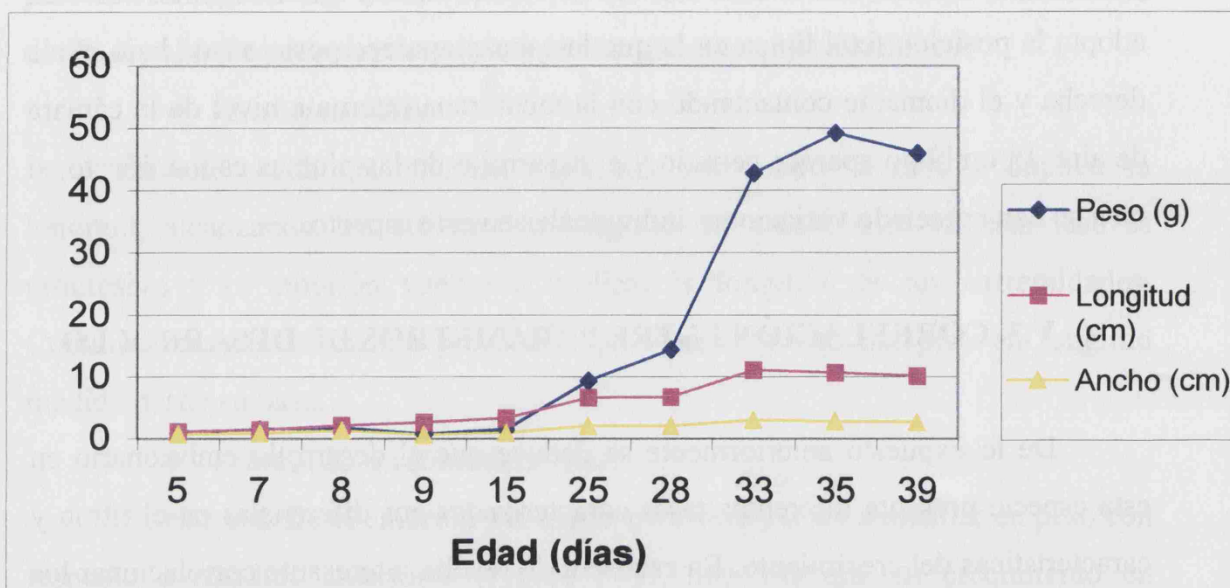


Gráfico 19: Variación del peso, longitud y grosor del embrión durante el desarrollo embrionario en el águila perdicera

V.4. CORRELACIÓN ENTRE DESARROLLO EMBRIONARIO Y PARÁMETROS DE LA CÁSCARA

Resulta de especial interés las correlaciones existentes entre el desarrollo embrionario y los parámetros de la cáscara, de modo que puedan elaborarse hipótesis sobre los posibles efectos negativos sobre el desarrollo del mismo.

Realizado el coeficiente de correlación de Spearman en relación con la posible relación entre el número de vesículas presentes en las membranas testáceas y el desarrollo alcanzado por el embrión expresado en días, se encontró una correlación negativa significativa ($p=0.04$). Esto indica que a mayor número de vesículas presentes, menor es la edad alcanzada por el embrión. Existe una correlación significativa entre pares de valores con un nivel de confianza del 95%. Los análisis estadísticos indican que el modelo lineal propuesto es adecuado para la descripción de estos datos.

Se compararon los grosores totales de la cáscara y de cada una de sus capas con la fertilidad e infertilidad del huevo, y con el grado de desarrollo embrionario. Los resultados estadísticos indicaron que si bien el grosor es menor en huevos eclosionados, las diferencias no son significativas en cuanto al grosor de la cáscara o de cualquiera de sus capas entre huevos fértiles e infértiles.

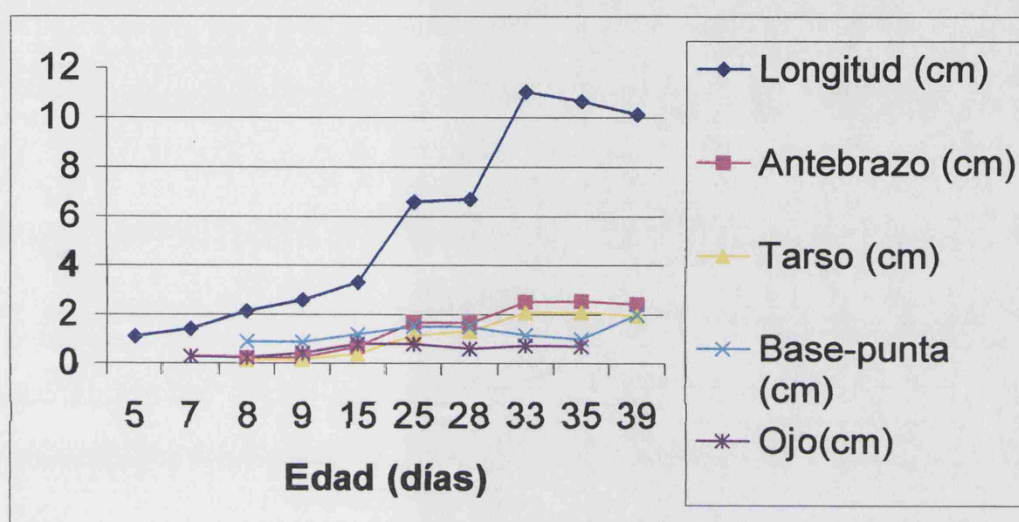


Gráfico 20: Evolución de la longitud total del embrión, antebrazo, tarso, pico desde su base y diámetro ocular en el desarrollo embrionario del águila perdicera.

Seguidamente se realizaron las correcciones necesarias para excluir aquellos estadíos iniciales inferiores al último tercio de desarrollo, cuando se produce la absorción importante de calcio. Los resultados mejoraron en cuanto a significación pero no llegando a ser significativos, situándose en $p=0.20$.

DISCUSIÓN

I. CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS Y ULTRAESTRUCTURALES, VALORES DE REFERENCIA Y CORRELACIÓN ENTRE MAGNITUDES.

I.1. VALORES DE REFERENCIA DE LA ESPECIE

1. Cutícula

- *Número total de poros por unidad de superficie.*

El número total de poros varía notablemente entre especies (Tullett, 1975), la razón es que las masas de los huevos son obviamente distintas. Dado que la conductancia media de los poros es similar para las diferentes especies de aves ($1.5 \mu\text{g (d.torr)}^{-1}$), y que el flujo de oxígeno y vapor por poro es de 60 y $54 \mu\text{l}\cdot\text{d}^{-1}$, la conductancia y el flujo de gases son directamente proporcionales al número de poros.

En el águila perdicera el número total de poros varió notablemente entre poblaciones, pero también notablemente entre individuos. Esta misma variación ha sido observada en otras muchas especies, tanto domésticas (Ronanoff y Romanoff, 1949) como salvajes (von Nathusius, 1868). Las desviaciones standard halladas en el presente estudio asemejan a las referidas por Gonzalez e Hiraldo (1988) para el águila imperial, lo que indica que este fenómeno también se produce en rapaces que comparten similar nicho ecológico.

El número de poros en el águila perdicera es, en términos generales, muy superior, en ocasiones hasta 50 veces los referidos para esta última especie. Del mismo modo, el área media de poros es obviamente también superior. Sin embargo, tras el estudio de los canales a través de la capa de cristalización externa y el resto de las capas de la cáscara, hemos constatado que tan sólo un pequeño porcentaje de los mismos profundiza más allá del comienzo de la capa mamilar. Estos aspectos se detallan en el siguiente capítulo.

Tras un tratamiento ácido severo de la cáscara del águila perdicera se pone de manifiesto la amplia red de canales de aireación por unidad de superficie. Algunos poros se comunican mediante estos espacios y de forma inmediata con la superficie. En este sentido, la presencia de cutícula es posible que juegue un papel fundamental en la regulación de la pérdida de humedad en esta especie. No obstante, hoy se sabe que la forma del poro influye de forma notable en su conductancia, y en especial el diámetro de estos en su parte más estrecha (Toien et al, 1987).

El grosor de cutícula en el huevo del águila perdicera es aproximadamente un 10% superior a la referida para el huevo de gallina (El-Boushy et al, 1968), mientras que la diferencia en peso fresco es de un 20% entre medias en las dos especies. La importancia de esta capa en la regulación de la pérdida de agua ha sido constatada por Peebles et al, 1998. Sin embargo, el mismo autor indica que su eliminación mediante lavado no parece tener efectos negativos en la tasa de eclosión en la gallina.

- *Presencia o ausencia de cutícula y sus características.*

La presencia de cutícula no es un rasgo característico de todas las especies de aves. En especies como la paloma se ha descrito la ausencia de esta estructura (Board, 1974). La presencia de cutícula en el águila perdicera podría supuestamente estar relacionada, como en otras aves, con la incubación en climas secos con lo que contribuiría a evitar la pérdida excesiva de agua durante la incubación (Board y Halls, 1973).

La cutícula en el águila perdicera no presenta gránulos, lo cual es posible que esté relacionado con la ausencia total de pigmentación en esta especie, ya que dichos gránulos se cree contienen pigmentos (Kennedy and Vevers, 1976). Las variaciones en la apariencia de la superficie externa de esta capa es motivo de debate.

Cabe teorizar acerca de las posibles causas de esta divergencia, habiendose encontrado ambas texturas en huevos fértiles o infértiles de todas las poblaciones.

Dado que muchos de estos puede que hayan sido incubados durante periodos de tiempo ciertamente similares, cabría pensar en la posibilidad de que se trate de una variación normal dentro de la especie. La textura regular aparece en muchos huevos de los que sabe por el desarrollo embrionario han sido incubados, así como en huevos que han eclosionado con normalidad. Del mismo modo, superficies irregulares aparecen en huevos de los que se conoce han sido incubados por periodos cortos de tiempo debido a la caída del nido. Si bien la incubación tiende a irregularizar la superficie, esta no es la causa de la presencia de estos dos patrones distintos.

Existe controversia acerca del posible papel antimicrobiano de esta capa, si bien el paso de bacterias aprovechando los poros no se ve impedido en cualquier caso.

En el águila perdicera no se ha encontrado la capa denominada de vaterita presente en aves como el pelícano, y la cutícula asemeja a la descrita en otras aves rapaces, si bien destaca la ausencia de vesículas en todas las muestras examinadas

- *Presencia o ausencia de estructuras adicionales: esferolitos, vesículas, material en la entrada de los poros, y fracturas radiales.*

El hecho de que la presencia de esferolitos tan solo se haya constatado en un caso, asociado a otras anomalías estructurales, clasifican la aparición de estas estructuras en el águila perdicera como anormales. Se ha especulado sobre la posible relación de los esferolitos con contaminaciones por pesticidas en rapaces (Erben y Krampitz, 1971). El mismo origen ha sido sugerido por González e Hiraldo (1988) que destacan la posibilidad de su relación con niveles elevados de DDE en el águila imperial, especie que en ocasiones comparte habitat con el águila perdicera en España, y en concreto en el área de Castilla-La Mancha.

Estas formaciones globulares también se han descrito en aves acuáticas (Board y Scott, 1990; Board, 1991), destacándose su elevado contenido en azufre y fosfato cálcico no calcificado. En el caso positivo registrado en la población de Castilla-La Mancha, no se han detectado niveles elevados de pesticidas en

contenidos de huevos procedentes de territorios adyacentes. Resulta vital seguir investigando estos aspectos mediante la provisión de muestras de contenido procedente de éstas áreas.

La presencia de material en la entrada a los poros se ha detectado tan sólo en cuatro del total de muestras analizadas. Sin embargo, tan sólo en una de ellas estuvo asociada a la presencia de esferolitos y otras anomalías de la cáscara. El resto fueron huevos fértiles que no llegaron a eclosionar, habiéndose descartado causas de tipo infeccioso. La muerte embrionaria en estos huevos tuvo lugar en los días 8 y 25 del desarrollo embrionario. En la gallina se ha descrito que los poros se encuentran ocluidos por esferas de material proteináceo (Tyler y Geake, 1953), mientras que en otras especies pueden estar constituidos por material inorgánico (Board, 1980).

La posible función de este tipo de material no es bien conocida, si bien se cree que pueda estar relacionada con el intercambio gaseoso. Este intercambio se ve favorecido por el desgaste de la superficie producido durante la incubación, lo que da lugar a un aumento de la conductancia dado que esta es directamente proporcional al número de poros. La presencia de este tipo de material se ha sugerido como posible causa de las diferencias encontradas para los valores de conductancia de vapor de agua en especies como la gallina (Toien, 1987).

- *Aspecto de la cutícula.*

Uno de los aspectos más interesantes es la apariencia regular o irregular de la cutícula. Es posible que pueda estar influenciada en parte por el periodo de incubación. Sin embargo, la presencia de cutículas de superficie irregular se ha asociado a grosores superiores de la capa mamilar. El grosor de esta capa disminuye en el último cuarto de la incubación pero esta variable no es probable que haya influido en la gran mayoría de las muestras analizadas, ya que fueron incubadas a tiempo completo.

Es probable que otros factores implicados en el grosor de esta capa puedan influir en el grosor de la cutícula, ya que ésta se forma en la glándula coquiliaria

como las estructuras anejas. La irregularidad de la cutícula requiere una especial atención, ya que cutículas irregulares se han citado como resultantes de niveles elevados de DDE en garzas (Cooke, 1975).

2. Capa de cristalización externa

La estructura y dimensiones de esta capa parecen estar relacionadas con importantes características de la cáscara, algunas de ellas esenciales para el mantenimiento de su integridad. Esta capa conforma aproximadamente más de un cuarto del grosor total de la cáscara.

La mayoría de los estudios donde se citan alteraciones de la estructura de la cáscara no mencionan esta capa ya que se incluye dentro de la capa de empalizada. En concreto cuando se mencionan disminuciones en el grosor de la misma. La compactación que adquiere esta capa parece importante en la capacidad de resistencia de la cáscara a la fractura, y su grosor se relaciona con el de la capa mamilar y la correcta distribución de los cuerpos mamilares.

La disposición de los canales en esta especie asemeja a la de la cáscara del huevo de avestruz, si bien la captación de canales se produce en la primera porción de la capa de empalizada y no a mayor profundidad. Podemos argumentar que esta disposición peculiar puede contribuir a minimizar el impacto de una reducción significativa del número de poros en superficie, o la obliteración de los mismos en función de un efecto colateral.

- *Grado de cristalización.*

Se ha constatado que el grado de cristalización de esta capa es acorde con el observado en la capa de empalizada. Cuando el grado de cristalización es adecuado, pese a estar bien definidas, ambas capas se imbrican notable y progresivamente formando una sola entidad. De hecho, esta capa es descrita por otros autores como parte de la capa de empalizada (Burley y Vadehera, 1989).

En ausencia de una estratificación clara, acompañada de la pérdida de cristalización en la capa de empalizada, se aprecia como ambas capas llegan a

confundirse al menos hasta la mitad del espesor de la cáscara. La presencia de esta capa y su alto grado de definición aparece también en otras grandes águilas como el águila imperial o el águila real. En otras especies de aves como la paloma o la perdiz esta capa puede decirse que forma parte de la capa de empalizada, adoptando esta última la disposición de cristales perpendiculares a la superficie. Tal vez por este motivo, la capa de cristalización externa no ha recibido la atención necesaria.

Los estudios que refieren disminución del grado de cristalización como consecuencia de niveles elevados de organoclorados en aves rapaces (Ratcliffe, 1970; Newton, 1979; Gonzalez e Hiraldo, 1988) se centran en la capa de empalizada dado lo espectacular de ésta en las grandes águilas. Analizando los registros gráficos de algunos de estos estudios, es posible apreciar que las alteraciones afectan también a esta capa.

El hecho de que la definición y trayectoria de los poros a este nivel se relacionen con el grado de cristalización, implica que pueda afectar a la conductancia del huevo. La conductancia se ha comprobado que depende de la forma del poro, fundamentalmente en su porción más estrecha (Toien et al, 1987). Esto es especialmente notable en poros con forma de trompeta como en el caso del águila perdicera.

3.Capa de empalizada

- *Área.*

El área de esta capa en el águila perdicera es ciertamente importante y proporcionalmente superior a otras águilas. Su magnitud es superior en la población del Algarve. Esta diferencia es menor de la esperada, si tenemos en cuenta las amplias diferencias en el grosor como parámetro relacionado. Esta diferencia podría justificarse por un aumento de la capa de cristalización externa en el caso de la población Castellana. Sin embargo, éste no es significativo. Esto indica que, posiblemente, esta capa es más regular en el caso de la población

española. Aún cuando el grosor sea muy inferior, la regularidad hace que el área no disminuya de forma tan notable.

- *Número de vesículas.*

Hasta que punto la mayor o menor porosidad de esta capa influye en la resistencia a la rotura, es un concepto poco estudiado. En algunos de los estudios sobre los efectos de los pesticidas organoclorados se ha citado una reducción en la porosidad de la cáscara en referencia al número de poros en superficie (Cooke, 1973, 1979; Peakall et al, 1973).

En el presente estudio, la reducción del número de vesículas en las áreas de menor densidad de la cutícula se une a una disminución del grosor de esta capa en la población española, y también en un buen número de muestras procedentes de la población del Duero. Becking, en 1975, comparó el número de vesículas presentes en la matriz orgánica en huevos de diferentes especies de aves. Estos se encontraron en mayor número en las especies tropicales, lo que ha dado lugar a la hipótesis de que tengan un papel relevante en el intercambio gaseoso. Es posible, que el mayor número de vesículas en la población del Algarve responda en parte a la mayor humedad relativa existente en las áreas de cría en comparación con las parejas Castellanas de climatología más seca.

- *Ángulo de orientación de los cristales.*

Se relaciona con el grado de cristalización de la muestra y no se observan variaciones notables entre poblaciones. Esto sugiere que, en el caso de tratarse del efecto de pesticidas, estos conllevan una reducción en el grosor de la cáscara, pero no afectan de forma significativa al grado de cristalización de la misma.

La correlación de la orientación de los cristales con la presencia de estructuras de cristalización amorfas está presente también en esta especie. El grado de significación es menor que en otras especies como el águila real (Ratcliffe, 1970) o el águila imperial (Gonzalez e Hiraldo, 1988).

- *Grosor.*

El grosor de esta capa es muy superior en la población del Algarve en comparación con la población castellana, mientras que la población de los Arribes del Duero se situaría en un nivel intermedio. La causa primaria podría ser la desaparición de la capa de orientación longitudinal en la base de la capa de empalizada en la población española, y la escasa presencia de la misma en la población del Duero.

Esta capa se asemeja a la descrita en el pollo por Cooke (1978) como banda clara a la transmisión, la cual parece disminuir progresivamente en función de la reducción del calcio en la dieta hasta la total desaparición. Un fenómeno similar puede estar ocurriendo en el caso del águila perdicera como resultado de la acción acumulativa de ciertos tóxicos.

- *Grado de cristalización.*

El grado de cristalización es un parámetro relevante en la fortaleza final de la cáscara como estructura. En general, las referencias a este aspecto en estudios sobre aves rapaces se han realizado en relación con la disminución del grosor de la cáscara y del número de poros en aves con niveles elevados de organoclorados (Stickel, 1975).

Gonzalez e Hiraldo (1988) han observado una disminución significativa en el grado de cristalización en cáscaras de águila imperial de la década de los ochenta comparadas con cáscaras antiguas en nuestro país. Estas alteraciones se han relacionado por otros autores con la presencia de esferolitos (Erben y Krampitz, 1971; Peakall et al, 1973; Cooke, 1979; Board y Perrot, 1979; Kiff et al, 1979).

En el presente estudio la presencia de esferolitos cursó con niveles medios de cristalización. De forma adicional, si se han observado cristalizaciones deficientes ligadas a la presencia de material en los poros. Si se encontró correlación entre el grado de cristalización de la capa de cristalización externa y la capa de empalizada.

La forma en como los cristales de carbonato cálcico crecen y se orientan no es bien conocida. Las proteínas de la matriz pueden dirigir de alguna forma este crecimiento (Silyn-Roberts and Sharp, 1986). También es posible que el crecimiento sea por epitaxia y que, en este caso, las proteínas de los conos mamilares tengan una especial relevancia. Esta última es posible que sea una explicación más verosímil del porqué de las disminuciones del grosor de la cáscara y del número de poros en huevos con niveles excesivos de organoclorados. Se ha comprobado que la disminución en el número de mamilas se acompaña de una reducción en el número de poros, lo que podría explicar el cuadro observado en este tipo de intoxicaciones.

4. Capa mamilar

- *Grosor.*

El grosor de la capa mamilar en esta especie es inferior en comparación con otras, en favor de grosores superiores de las capas restantes. Se aprecia un cierto aumento del grosor en la población castellana si bien no es significativo en relación con las otras poblaciones. En algunas especies como el pato, se ha constatado un aumento en el grosor de esta capa como consecuencia de niveles elevados de DDT en la dieta (Cooke, 1978).

Es posible que esta tendencia pueda estar relacionada con el mismo fenómeno en el águila perdicera. Sin embargo, la tendencia en este tipo de intoxicaciones por organoclorados es a dar lugar a una reducción en dicha capa, que incluso llega a ser más significativa que la acusada en la capa de empalizada en aves como el águila imperial (González e Hiraldo, 1988).

- *Área.*

En relación con lo descrito en el punto anterior, este aumento en el grosor da lugar a un aumento no significativo en el área total al corte de esta capa en la población Castellana.

El grado de cristalización, al igual que sucede en la capa de empalizada, no se ve afectado en relación con otros parámetros. Von Nathusius, en 1874, propone la utilización del área mamilar al corte como parámetro para diferenciar entre especies, por lo que resulta interesante el estudio genético comparativo de ambas poblaciones. No obstante, es necesario descartar la influencia de posibles tóxicos ambientales tal y como mencionábamos en el apartado anterior.

- *Área del sistema de ventilación mamilar.*

Se ha detectado un aumento significativo de este parámetro en la población castellana, esto se debe posiblemente a la alteración constatada en la distribución de los núcleos de cristalización y los fenómenos de multinucleación. Esto da lugar a la aparición de mayores espacios entre mamilas que se piensa puedan repercutir negativamente en la fortaleza de la cáscara.

- *Distancia entre conos.*

Pese a las alteraciones constatadas este parámetro no sufre apenas variación. Esto puede deberse al método de cuantificación. Los fenómenos de multinucleación dan lugar efectivamente a núcleos pequeños muy cercanos dentro de la misma mamila pero, al mismo tiempo, se produce un aumento del espacio entre mamilas, de modo que fuera de ellas los núcleos están más alejados. El sistema de elección al azar implica que las distancias de los núcleos circundantes periféricos con respecto a otras mamilas aumentan la media general.

- *Superficie y número de núcleos mamilares.*

La disminución en estos dos parámetros es ciertamente notable cuando se comparan las poblaciones castellana y del Duero, con el Algarve portugués. Esta radical disminución es acorde con la mayor incidencia de fenómenos de multinucleación en estas poblaciones. Los factores que determinan la extensión de estos núcleos no se conocen en su totalidad si bien se conviene en afirmar que la estructura y distribución de las fibras de la membrana externa puedan jugar un papel fundamental. No en vano estos núcleos se forman como resultado de enlaces covalentes entre estas estructuras y la capa mamilar.

En efecto, la reducción de la densidad de núcleos mamilares es uno de los factores que parece comprobado contribuye notablemente a la reducción del peso de la cáscara. Este hecho se ha observado en el cernícalo americano como resultado de la intoxicación por DDE, en combinación con una reducción en el grosor de la cáscara (Kiff et al, 1979).

Las reducciones en el grosor de la cáscara y el índice de grosor en el halcón peregrino parece estar relacionado con un aumento en la fragilidad de la cáscara (Cooke, 1979), por lo que es necesario seguir indagando en estos aspectos en el caso del águila perdicera.

- *Grado de multinucleación.*

El fenómeno de multinucleación consiste en la aparición de mamilas que contienen varios núcleos mamilares y por tanto generadas a partir de ellos. Esta anomalía se ha descrito en relación con la ingestión de osteolatirógenos como el β aminopropionitrilo o la semicarbacida (Chowdhury y Davis, 1995). Estos productos inhiben la lisil oxidasa, encima necesaria para la formación de puentes cruzados entre moléculas estructurales. Este fenómeno da lugar a la fusión de fibras con la consiguiente distribución irregular de los puntos de nucleación.

En el presente estudio, el 80% de los casos de multinucleación se acompañó de fusión de fibras. No obstante, los grados detectados no son importantes, apareciendo una media de 3.5 núcleos por cono afectado. Chowdhury y Davis (1995), refieren el hecho de que estas sustancias, y las alteraciones estructurales que producen, dan lugar a un debilitamiento de la unión entre los cuerpos mamilares y la membrana externa del huevo, lo que puede contribuir al debilitamiento general de la estructura, aumentando la fragilidad del huevo.

Nuestros resultados indican que, en un 74% del total de casos de multinucleación, disminuyeron o no se encontraron restos de membrana adherida a los cuerpos mamilares tras el tratamiento químico con Na OH. Se desconoce la etiología y los posibles factores que regulan esta adherencia. Si los

osteolatirógenos están implicados, quedaría por resolver el interrogante de su origen en estas aves, y de si estos podrían ingerirse al consumir las presas.

- *Forma, tamaño y distribución de las mamilas.*

Los resultados del presente estudio correlacionan positivamente la regular disposición de las mamilas con el entramado igualmente regular de las fibras de la membrana externa. Sin embargo, en tres casos (21%), la irregularidad en la distribución de las fibras de la membrana externa no se acompañó de anomalías en la distribución de los cuerpos mamilares.

Distribuciones irregulares de los cuerpos mamilares se han referido en casos de ingestión de osteolatirógenos, así como ligadas a deficiencias de manganeso en la gallina. En el primer caso se debe a la fusión de fibras ocasionada por la ausencia de puentes cruzados entre proteínas, debido a la inhibición de la lisil oxidasa (Chowdhury y Davis, 1995). En el segundo caso parece originarse como resultado de una disminución en la síntesis de proteoglicanos (Leach y Gross, 1982).

La causa primaria de las alteraciones observadas en el águila perdicera es desconocida, si bien es claro que está relacionada con anomalías en la distribución de las fibras de la membrana externa. Los dos casos de máxima irregularidad registrados correspondieron a huevos infértiles, y se observó aumento del tamaño de las mamilas, posiblemente como resultado de la fusión de varios núcleos. En 1997, Arias y colaboradores, demostraron la existencia de moléculas de colágeno tipo X entrecruzadas, esenciales en la formación de las membranas. También hay pequeñas cantidades de dermatán sulfato, el mismo compuesto que hoy se sabe está presente en cantidades importantes en la capa de empalizada.

- *Conexión con membranas testáceas.*

Se ha especulado sobre la importancia del grado de unión entre la capa de los conos mamilares y la membrana externa. Un aumento significativo de la adherencia de estas membranas a la capa mamilar se ha constatado en aves alimentadas con dietas deficientes en cobre (Baumgartner, 1978). También como

resultado de la adición de β -aminopropionitrilo (Leach et al, 1981). Ambos casos están relacionados, ya que los latirógenos inhiben la lisil oxidasa, encima que contiene cobre. Una mejor unión entre ambas capas se ha demostrado incrementa notablemente la resistencia de la cáscara a la deformación (Orberg, 1990).

En el caso de los osteolatirógenos esto no ocurre debido a la irregular distribución de las mamilas que debilita sin duda la estructura. En el águila perdicera, las muestras en las que se constató la fragilidad de la cáscara con rotura de la misma durante la incubación mostraron adherencias normales o reducidas. Sin embargo, en estos casos, el grado de irregularidad en la distribución de los conos fue elevado, indicando que la densidad de los cuerpos mamilares contribuye a la fortaleza de la cáscara.

De acuerdo con Van Toldeo et al (1982), el aumento del tamaño de las mamilas no se correlaciona necesariamente con un aumento en la fortaleza de la cáscara, sino que este párametro está más relacionado con el área entre mamilas. En el águila perdicera, el aumento en el tamaño de la superficie de contacto se correlacionó positivamente con una mala adherencia. Esta se acompañó de una distribución irregular de las mamilas, lo que sin duda contribuye a un aumento de la fragilidad.

5. Cáscara

- *Grosor total.*

Existen grandes diferencias entre especies en su susceptibilidad a los pesticidas que dan lugar a reducciones significativas en el grosor de la cáscara. Este aspecto ha sido objeto de fuerte controversia y discusión durante las pasadas décadas especialmente en la interpretación de los resultados (Burley y Vadehra, 1989). Se ha demostrado que, en aquellas especies susceptibles, estos insecticidas disminuyen de forma significativa el grosor de la cáscara. El DDE interfiere con la acción de la calmodulina disminuyendo la unión de la progesterona a su

receptor, lo que indirectamente disminuye el transporte de calcio a la cáscara (Lundholm, 1988).

Hoy sabemos que otros pesticidas como los PCBs también disminuyen el grosor total de la cáscara en especies como el cernícalo americano (*Falco sparverius*) (Lowe y Stendell, 1991). En este caso, la reducción del grosor de la cáscara cursó con una reducción en el índice de grosor de la cáscara, a la que parece haber contribuido el aumento en el tamaño del huevo como tal.

El fenómeno referido no parece suceder en las poblaciones estudiadas de águila perdicera, donde la población con grosor más reducido se acompaña de huevos de menor tamaño con lo que este efecto parece quedar excluido. La misma conclusión ha sido expuesta por Ratcliffe (1970), quien refirió que si bien el tamaño de los huevos de ciertas rapaces en el Reino Unido no ha variado en los últimos cien años, sí lo ha hecho el peso de la misma, lo que indica una reducción de su grosor coincidente con el uso de organoclorados. Los estudios basados en intoxicaciones con Aroclor indican que el índice de grosor de la cáscara puede ser más sensible a la hora de evaluar los efectos del Aroclor (Lowe y Stendell, 1991).

Es importante destacar que el grosor total de la cáscara depende del tamaño del huevo, y se relaciona linealmente con el volumen del mismo (Romanoff y Romanoff, 1949). Sin embargo, en el caso del águila perdicera, los análisis demuestran que existe una cierta tendencia a la significación ($p=0.12$) entre la longitud del huevo y el grosor de la cáscara. Más aun, cuando se comparan el grosor y el ancho de la cáscara, la relación es muy significativa ($p=0.007$).

Posiblemente la amplitud del útero es un factor limitante en el desarrollo del huevo en mayor medida que su longitud. La correlación entre el volumen del huevo y el grosor de la cáscara no resultó significativa en el águila perdicera.

6. Membranas testáceas

Se trata de estructuras poco estudiadas en aves no domésticas. Se forman en el ítsmo granular por espacio de tiempo aproximado de una hora (Salomon, 1975).

La parte o núcleo proteico de las fibras parece ser sintetizado por las glándulas tubulares, mientras que el epitelio no ciliado puede ser el responsable de la síntesis de carbohidratos. Sin embargo, cómo adquieren la organización en núcleo y manto es completamente desconocido. En el águila perdicera ignoramos los factores que puedan llevar a un aumento en el diámetro de las fibras afectando a cada capa. El único aspecto que parece claro es que la encima lisil oxidasa es la responsable de la formación del aldehído de lisina que es el precursor de los puentes cruzados de desmosina e isodesmosina.

Las deficiencias de cobre dan lugar a carencias de esta encima lo que produce formaciones anómalas de la cáscara (Baumgartner, 1978). El número y área de los cuerpos mamilares puede estar relacionado con la distribución y densidad de estas fibras. Estos aspectos resultan de sumo interés para una mejor comprensión de la estructura final de la cáscara.

Muchos han sido los estudios que han correlacionado los niveles de diferentes pesticidas con alteraciones en la cáscara. Por el contrario se ha hecho escasa o nula referencia a las alteraciones de las membranas de la cáscara. Tan sólo en el caso de los osteolatirógenos se ha tratado ampliamente este aspecto (Chowdhury y Davis, 1995). Sin embargo, las intoxicaciones por DDE se ha constatado que reducen la densidad de los cuerpos mamilares (Kiff et al, 1979).

Las deficiencias de manganeso en la dieta, dan lugar a alteración en la distribución de los cuerpos mamilares, lo que se traduce en una disminución de su número por unidad de superficie, con la aparición de grandes áreas intermamilares.

El grosor de la membrana externa es siempre superior al de la interna, si bien la diferencia varía notablemente entre especies. Así, en la gallina es tres veces superior, mientras que en otras especies el coeficiente entre ambas magnitudes varia desde 1.5 para el avestruz hasta 7.5 para la codorniz. Este coeficiente es ciertamente constante dentro de una misma especie. En el águila perdicera se sitúa entre 1.2 y 2.2, valores semejantes a los encontrados en el cisne, como es característico de huevos medianos a grandes.

Las membranas son estructuras fundamentales durante la formación de la cáscara, pero también a posteriori para la vida y el desarrollo embrionario. Estas estructuras permiten el intercambio gaseoso (Wanguenstein et al, 1970), y actúan combatiendo el paso de microorganismos (Vadehra et al, 1972).

La gran mayoría de los lípidos de la cáscara se encuentran concentrados aquí, principalmente fosfolípidos, lípidos neutros, colesterol y ésteres. En el caso del águila perdicera desconocemos la composición de estas vesículas, si bien por su estructura es posible que contengan lípidos. Si es así, dada la lipoafinidad de los compuestos organoclorados, la ovoposición puede ser una vía de excreción en la hembra. Sin embargo, no se ha detectado una disminución del grosor de la cáscara, ni del número de poros en los casos estudiados.

Por el momento no se conoce con exactitud si estas fibras son secretadas por las células epiteliales, o por las células tubulares glandulares. Las alteraciones observadas pueden deberse al aumento de los niveles de organoclorados, los cuales pueden afectar a la síntesis y distribución de estas membranas. En la actualidad se investiga este último extremo. El hecho de que ocurra en las dos capas al mismo tiempo implica que los mecanismos de formación pueden estar alterados. En este sentido la capa interna, menos sujeta a variación, contiene ácido γ carboxiglutámico, mientras que éste no aparece en la capa externa. Es posible que la presencia de este compuesto prevenga de alguna manera la formación de estas vesículas.

Las estructuras mencionadas podrían estar relacionadas con acúmulos de metales como el cobre, ya que en la gallina, se ha observado que desaparecen cuando se suministran dietas deficientes en el mismo (Baumgartner et al, 1978). Esto puede relacionarse con la inhibición de la formación de la lisyl oxidasa, la encima implicada en la formación de puentes cruzados entre moléculas de colágeno y que contiene cobre. Dada la estrecha relación demostrada entre la aparición de estas estructuras y la fusión de fibras, es muy posible que estos

mecanismos están implicados, si bien la causa primaria requiere un estudio detallado.

I.2. TENDENCIAS Y CORRELACIONES ENTRE MAGNITUDES

Aquellas muestras de cáscara en las que se observan áreas extensas de cutícula poseen un menor número de poros y el área total de intercambio gaseoso es menor. Este fenómeno puede deberse a que ésta capa se deteriora progresivamente durante la incubación debido al roce, abriéndose nuevos poros que permanecían hasta entonces obliterados por esta capa.

En la gallina, la presencia y tamaño de las vesículas asociadas de forma normal a ésta capa varían también con la edad del huevo (Simons y Wiertz, 1985). No obstante, es posible que existan otros factores implicados en la regulación del grosor de esta capa durante la ovoposición, ya que la gran mayoría de las muestras fueron huevos incubados a término.

Las observaciones puntuales realizadas en muestras procedentes de huevos rotos por causas accidentales durante la incubación poseen áreas extensas de cutícula presente. El mismo fenómeno se aprecia en las muestras con anomalías ultraestructurales procedentes de huevos que se sabe quebraron en las primeras dos semanas de incubación. En este caso, la presencia de un menor número de poros puede estar ligada a otras causas primarias. La cutícula es una cubierta que se forma en la glándula coquilaria y se distingue incluso cuando el huevo tan sólo alcanza un 50% de su tamaño, lo que indica que deja paso al material que se deposita más tarde. Factores diversos que modifican el tiempo de permanencia del huevo en esta región pueden influir en el grosor de esta capa.

La cutícula se ha citado como la capa más variable entre especies en lo que a la estructura del huevo se refiere (von Nathasius, 1868) pudiendo variar en su grosor, presencia o aspecto.

En especies como las grullas es de aspecto rugoso, mientras que en otras como el avestruz es ciertamente liso. La relación entre el aspecto rugoso de la cutícula y el mayor grosor de la capa mamilar en el águila perdicera no se ha descrito con anterioridad en otras especies. Sin embargo, se observa que, en la población portuguesa, un 64% de las cáscaras presentan esta apariencia rugosa, mientras que la tendencia se invierte en la población castellano-manchega.

La estratificación de la la capa de cristalización externa puede contribuir al aumento del número de canales o conexiones entre los mismos. La longitud de estos canales se ha referido depende del grosor de la capa que atraviesan, y en otras especies algunos de estos canales pueden ser ciegos (Ronanoff y Romanoff, 1949).

Una de las explicaciones de este fenómeno sería el hecho de que, durante la incubación, la superficie sufre abrasión lo que hace que algunos de estos canales se abran a la superficie. Este proceso daría lugar a un aumento en el número de poros reales, favoreciendo la pérdida de humedad. Esta teoría podría explicar el hecho de que aumentos notables del grosor total de la cáscara se relacionen con un aumento del número de estos canales en el águila perdicera, lo que podría facilitar el intercambio gaseoso en estos casos. Se ha advertido que la morfología de los canales se hace más tortuosa cuando aumenta la estratificación en el águila perdicera.

El número de canales por unidad de superficie de corte se ha correlacionado significativamente con el grosor de la cáscara. Curiosamente, esta relación de asociación no es significativa entre el grosor total y el número de poros en la superficie, mientras que este último parámetro si se asocia significativamente con el grosor de la capa mamilar y de empalizada.

En algunas especies se ha constatado que aumentos en la altitud dan lugar a una disminución en el número de poros acompañada de un aumento del grosor de la cáscara (Carey et al, 1987). Por el contrario, pesticidas como el DDT

producen disminución en el grosor de la cáscara acompañada, en algunos casos, de una disminución en el número de poros.

La reducción del calcio en la dieta se acompaña de una disminución del grosor de la cáscara pero el número de poros permanece invariable. Sin embargo, la adición de acetazolamida da lugar a una reducción del grosor y del número de poros. Dado que la conductancia depende del número de poros, se trata de cambios ciertamente importantes para el desarrollo del embrión. De lo expuesto se deduce que estas dos variables pueden actuar y ser modificadas de forma independiente según que factores. Es interesante ver como varía el número de canales en estas circunstancias.

En ocasiones se ha observado que algunos de estos canales confluyen en el águila perdicera tal y como sucede en aves como el avestruz. Se ha sugerido que pueda tratarse de un sistema presente en huevos grandes para ayudar a la correcta pérdida de agua debido a su gran volumen. Desconocemos si el número de canales y conexiones puede actuar como regulador de los cambios en la porosidad general del huevo. De esta forma, incrementos en el grosor se corresponderían con aumentos del número de canales para conectar poros en el interior de la capa externa, lo que explicaría la falta de asociación.

El número total de poros y el área total de intercambio gaseoso se relacionan positivamente con el grosor y área de la capa de empalizada, y negativamente con los mismos parámetros de la capa mamilar. Sin embargo, el número de poros se correlaciona positivamente con el número de núcleos mamilares. Los grados de significación en ambos casos son idénticos.

Tullett en 1975 describió que, en 34 especies distintas de aves, el número de poros por unidad de área es directamente proporcional al número de mamilas. En el caso del águila perdicera también se cumple, y la relación es positiva y altamente significativa, ya que Tullett realmente considera el número de mamilas como el número de centros de nucleación.

En el presente estudio es importante hacer notar esta diferencia, ya que se han estudiado de forma independiente los centros de nucleación claramente visibles, de las mamilas entendidas como unidades. Esta relación entre poros y centros de nucleación indica que, también en el águila perdicera, la densidad de poros puede estar controlada por la síntesis de núcleos mamilares.

El grado de cristalización de la capa de cristalización externa se correlaciona positivamente con el mismo parámetro en la capa de empalizada. La relación es lógica ya que muchos autores describen la primera como la parte externa de la segunda (Burley and Vadehra, 1989).

La presencia de dermatán sulfato como componente fundamental en ambas capas (Arias et al, 1992), pero no en la capa de los conos mamilares, indica que este compuesto pueda también estar implicado el grado final de cristalización. No obstante, es necesario abordar estudios sobre la composición de la matriz orgánica en estas aves, al objeto de corroborar estas hipótesis. Una correcta cristalización de esta capa se asocia con conexiones significativas entre las mamilas y la membrana externa. Este hecho resulta de sumo interés, ya que el keratán sulfato es el proteoglicano fundamental en esta localización. Sin embargo, existen cantidades pequeñas de dermatán sulfato que podrían influir también en la cristalización.

Hoy se conoce que la matriz de los núcleos se forma en función de los enlaces covalentes que se establecen entre la matriz de los cuerpos mamilares y la membrana externa (Robinson y King, 1968; Bellairs y Boyde, 1969). En esta última, en la gallina, se ha demostrado existen también pequeñas cantidades de dermatán sulfato. Este extremo permite sugerir la hipótesis de que este proteoglicano sea responsable en gran parte de la deposición de cristales, y de forma secundaria, de factores fundamentales de la fortaleza de la cáscara.

Un correcto grado de cristalización de la membrana externa se correlacionó con infertilidad en los huevos examinados. Desconocemos el significado que pueda tener este dato y la posible influencia de la síntesis de algunos de estos proteoglicanos en el transporte espermático en la zona del istmo.

La relación entre el número de vesículas en la capa de empalizada, el número de poros en superficie y el grosor total de la cáscara indica que la porosidad esta relacionada con la estructura global de la cáscara. Posiblemente, las cáscaras gruesas requieren una mayor capacidad de intercambio gaseoso.

El ángulo de orientación de los cuerpos poliédricos en la capa de empalizada no se relaciona significativamente con otros factores de cristalización o de la matriz orgánica como el área de núcleos mamilares o el número de los mismos. Esto puede indicar que la orientación de estas columnas se rige posiblemente por factores distintos a los implicados en la formación de la matriz. La hipótesis que sugiere la influencia de fenómenos de epitaxia quedaría reforzada.

Durante la incubación, el embrión toma el calcio necesario para la formación del esqueleto fundamentalmente de la cáscara, cifrándose en un 82% en el caso del pollo (Simkiss, 1961) y 84.2% en la codorniz (Ono y Wakasugi, 1984). La base de los conos se cree es la primera fuente de calcio para el embrión, si bien el contacto de la membrana corioalantoidea con la cáscara no ocurre hasta el día diez de incubación en el pollo (Terepka et al, 1969).

La absorción del calcio se ha argumentado como causante de un 5% de disminución en el grosor total de la cáscara en huevos fértiles de pollo incubados a término (Simkiss, 1967), produciéndose durante el último cuarto de la incubación. Sin embargo, estudios en aves salvajes demuestran que en especies como el pelícano o la grulla estas diferencias no son significativas. En el caso del águila perdicera las diferencias entre medias en relación con el grosor de la capa mamilar alcanzaron el 24%, porcentaje muy superior al explicable por este fenómeno. Los estudios estadísticos muestran que la infertilidad o fertilidad del huevo no se relacionan significativamente con el grosor de la capa mamilar, ni con la forma de la mamila.

Mamilas cónicas parecen asociarse significativamente con un mayor número de fibras de la membrana interna

Tras un examen detallado de las correlaciones existentes entre diferentes parámetros de la capa mamilar, muchos de ellos reflejan la presencia abundante de fenómenos de multinucleación extendidos en esta especie. Las correlaciones de la distancia media entre núcleos y el área entre mamilas y el área mamilar explican perfectamente el fenómeno. Cuanto mayor es la distancia media entre mamilas, menor es el número de estas y mayor el número de núcleos. En los casos de multinucleación los núcleos son pequeños y agregados, dando lugar a mamilas grandes e irregulares por fusión, pero que dejan un gran espacio entre ellas debilitando la arquitectura global de la cáscara.

Los resultados indican que se trata de un proceso anómalo extendido en el águila perdicera, sin que hasta el momento conozcamos la causa. Se comprueba estadísticamente que el aumento del área entre mamilas da lugar a una reducción notable de la adherencia entre éstas y la membrana externa.

La correlación negativa existente entre el tamaño de las mamilas y el grado de multinucleación indica que, si bien el fenómeno de multinucleación da lugar a mamilas compuestas de tamaño muy superior al normal, esto no implica que el fenómeno se agrave con el aumento medio en el tamaño de las mismas. Muy al contrario, los grados más elevados de multinucleación ocurren en cáscaras con un tamaño medio de mamila pequeño. Tal y como se deriva de los resultados, éste es el más común en esta especie.

Cabría de esperar que, dado que la multinucleación en sí conlleva una distribución anómala de los núcleos de cristalización, esta pueda estar ligada a una distribución anómala de las fibras. Sin embargo, no se ha encontrado correlación significativa entre el grado de multinucleación y la regularidad en la distribución de las fibras de las membranas. Esto puede implicar que la distribución de los núcleos de cristalización depende de otros factores.

El hecho de que la distribución de las mamilas, y por ende de estos núcleos, no se haya correlacionado significativamente con ninguna de las demás variables habla en favor de esta hipótesis. Diversos autores han argumentado sobre

al posibilidad de que el grado de adhesión entre membrana externa y mamilas influya de algun modo en la fortaleza de la cáscara (Orberg, 1990; Chowdhury and Davis, 1995). En el presente estudio grados importantes de conexión entre la membrana externa y la capa de los conos se correlacionaron de forma significativa con tamaños reducidos de mamila, normales para la especie. Esto sugiere que una cohesión adecuada es un factor importante.

Durante el examen en profundidad de aquellos casos en los que se constató la rotura de los huevos durante el periodo de incubación, se apreciaron mamilas de tamaño superior al habitual y falta de adhesión entre éstas y la membrana externa. Esta correlación fue significativa ($p=0.033$), lo que sugiere la importancia de esta relación en la ultraestructura del huevo normal del águila perdicera.

Especialmente interesante es la relación existente entre las estructuras de la capa mamilar, el grosor total de la cáscara y el número de poros. A estas dos últimas magnitudes se han referido una cantidad importante de trabajos centrados en la influencia de pesticidas en la cáscara. Sin embargo, el presente estudio demuestra el impacto de los fenómenos de multinucleación constatando que el número de mamilas se relaciona negativamente con el grosor de la cáscara y la superficie de intercambio aéreo.

La distancia entre núcleos y el número de los mismos se relacionan positivamente. Con estos datos se puede sugerir que la presencia de multinucleación, o la causa primaria que origina este fenómeno, da lugar a una disminución notable del grosor de la cáscara, acompañada de un descenso en el número de poros por unidad de superficie.

Resulta interesante analizar la posible repercusión de la disminución en el grosor de cada una de las capas en el grosor total de la cáscara en función de la significación de la correlación entre parámetros.

El hecho de que el grado de significación sea superior, en el caso del área y grosor de la capa de cristalización externa, sugiere que esta pueda tener una especial relevancia en el grosor total de la cáscara en esta especie. Es factible

pensar, por tanto, que disminuciones en esta capa den lugar a importantes reducciones en el grosor total.

En muchos de los estudios realizados sobre contaminantes, de los que se conoce reducen significativamente el grosor de la cáscara, como organoclorados (Bunk et al, 1985) o PCBs como el Aroclor ®1254 (Lowe y Stendell, 1991), no se detalla la afección de las capas. Cooke en 1975, indica que a la reducción del grosor de la cáscara en pollos a los que se les adicionó sulfanilamida en la dieta contribuyeron igualmente ambas capas, mientras que en los que se les redujo el calcio en la dieta, la disminución del grosor de la capa de empalizada fue mayor que en la capa mamilar. El mismo autor cita reducciones en la primera capa, pero no en la segunda, en patos a los que se adicionó DDT en la dieta.

En garzas con niveles altos de organoclorados la relación entre el grosor de la capa mamilar y el grosor total de la cáscara fue altamente significativa, tal y como ocurre en el águila perdicera. Existen diferencias importantes entre especies que es necesario tener en cuenta.

El número y diámetro de las fibras de las membranas testáceas se relaciona negativamente, esto implica que a mayor número menor diámetro. Este aspecto es fundamental ya que hoy se sabe que estas fibras contienen colágeno tipo I, V y X , y que la lysil oxidasa interviene en la formación de los puentes cruzados entre moléculas. Curiosamente, a mayor número de fibras menor número de núcleos, esto implica que ha de existir un equilibrio crucial entre estas magnitudes y que tanto excesos como defectos pueden dar lugar a alteraciones.

Las sustancias como osteolatrógenos que inhiben la lisil oxidasa dan lugar a una distribución anómala de las fibras, y a un número inferior de estas por unidad de superficie estudiada.

En el águila perdicera, la disminución del número de fibras se acompaña de un mayor número de centros de nucleación, pero una mayor área media de los mismos. Sin embargo, las correlaciones entre el diámetro medio de las fibras y el área media por núcleo no son significativas. Esto indica que, posiblemente, en esta

especie, el tamaño de los centros de cristalización venga dado por la densidad de las fibras. Sin embargo, todas estas magnitudes, incluido el diámetro medio de fibras, se correlacionan significativa y positivamente con el grosor de la cáscara. Estas estructuras en su totalidad pueden influir en el grosor de la cáscara como tal.

El grado de significación ($p=0.04$) de la correlación entre el diámetro medio de las fibras y el grosor de la cáscara sugiere que, factores implicados en la formación de dichas fibras y posiblemente en su composición, puedan influir en el grosor final de la cáscara. Las fibras están constituidas por proteínas, lípidos, y carbohidratos.

Un análisis detallado de la variación en la composición en fibras de diferente diámetro puede ayudar a la mejor comprensión de los factores implicados. Un examen estadístico adicional de la correlación entre el diámetro de las fibras y el grosor de las diferentes capas de la cáscara indica que, aunque las correlaciones no son significativas, existe una tendencia importante en la correlación con el grosor de la capa mamilar ($p=0.07$). El dermatán sulfato es un componente común entre la matriz orgánica de la cáscara y las membranas, por lo que es posible que este relacionado con estas circunstancias.

II. VARIACIÓN EN LOS PARÁMETROS ESTABLECIDOS EN FUNCIÓN DE FACTORES FISIOLÓGICOS, GEOGRÁFICOS Y CLIMATOLÓGICOS, GENÉTICOS E INMUNOLÓGICOS

II.1 FACTORES FISIOLÓGICOS

II.1.1. Edad de la hembra

En la gallina, el tamaño del huevo varía con la edad de la hembra siendo los huevos menores durante los primeros años para alcanzar un máximo y posteriormente disminuir con la senectuz (Romanoff y Romanoff, 1949). En nuestra experiencia con aves rapaces hemos constatado la misma observación.

En la población salvaje examinada es complejo saber la edad real de muchos de estos individuos, lo que dificulta el análisis. La variación encontrada en la longitud, es de hasta un centímetro mientras que el ancho varía en medio centímetro. La presencia de huevos caracterizados como pequeños en todas las poblaciones puede indicar una variación individual, posiblemente debido a la edad de la hembra. En uno de los casos, la hembra falleció en el último año de estudio, sin que se conozca la causa de la desaparición, siendo factible que se tratara de una hembra de edad avanzada.

El tamaño se relaciona también con la edad de la hembra cuando alcanza su madurez sexual. Las águilas perdiceras pueden comenzar a poner excepcionalmente durante el tercer año de vida, cuanto más joven es la hembra al realizar la primera puesta, menor es el tamaño de los huevos (Romanoff y Romanoff, 1949). Este puede ser otro de los factores que influya de forma notable en el tamaño de alguno de los huevos examinados. Obviamente este aspecto está relacionado con el peso del ave en el momento de la puesta.

En aves como la gallina, en la que existen enormes diferencias entre razas en cuanto al tamaño, este afectan notablemente al tamaño del huevo y el de la hembra durante la primera puesta. Algo similar sucede a menor escala en el águila perdicera. Hemos comprobado que los pollos pertenecientes a la población del Algarve son significativamente superiores en peso y tamaño a los pollos de la población española con la misma edad.

Este fenómeno puede deberse a diferencias genéticas, pero también de tasa de crecimiento, lo que indica que las perdiceras de Algarve de tamaño superior crecen más deprisa y consecuentemente pueden alcanzar la madurez sexual con mayor rapidez que la población Castellana. Esta rapidez posiblemente pueda verse

influida por las diferencias en latitud entre ambas poblaciones. Consecuentemente su tamaño también será superior al de estas últimas durante la primera puesta, por lo que sus huevos tendrán un tamaño superior.

Tal y como se ha descrito en aves domésticas, el tamaño del huevo varía según el orden en el ciclo de puesta. El primer huevo suele ser el mayor, disminuyendo en tamaño de forma progresiva en el ciclo.

Este fenómeno ocurre también en las rapaces, especialmente el último huevo de la serie de puesta. En nuestro estudio resulta prácticamente imposible determinar el orden en la puesta, por lo que la influencia de este parámetro no ha podido determinarse.

II.1.2. Estado nutricional y tamaño de la hembra.

Los estudios realizados en aves domésticas indican que el tamaño del huevo se ve poco afectado por el estado nutricional, dentro de unos límites razonables. Este factor parece tener una mayor influencia en el número de huevos por ciclo ovular (Romanoff y Romanoff, 1949).

El consumo de proteína parece ser el constituyente de la dieta que más puede influir en este aspecto. No obstante, se han descrito un número importante de micronutrientes, cuyo exceso o carencia puede dar lugar a alteraciones de la cáscara. Resulta difícil conocer el estado nutricional de los adultos implicados en este estudio basándose en datos de la abundancia de presas o en el estado nutricional de su descendencia.

En las aves domésticas, se ha comprobado que el grosor de la cáscara aumenta en dietas con el aporte adecuado de calcio. Obviamente el calcio no se asimila del mismo modo de todas las fuentes posibles. En el caso de aves salvajes y en concreto del águila perdicera, la variedad de presas que consumen es importante y balanceada, resultando altamente improbable la carencia de este elemento en ausencia de ciertas patologías. No sucede lo mismo para otros

elementos que, si bien se encuentran en pequeña proporción en la cáscara, se han revelado como fundamentales en su correcta formación.

Este es el caso del manganeso, cuya carencia da lugar a alteraciones en el tamaño y por tanto la densidad y distribución de las mamilas (Lach y Gross, 1982). Este efecto no es sorprendente debido al conocido papel del manganeso en la síntesis de polisacaridos, lo que da lugar a una reducción de hexosamina y ácido exurónico.

Las investigaciones de Cooke y Blach en 1970, indicaron que los núcleos mamilares son ricos en estos compuestos, lo que introduce la posibilidad de que se vea afectado el inicio de la formación de la cáscara. El resultado es un aumento el tamaño de las mamilas que parece resultar de la fusión de las mismas. Un fenómeno similar se ha constatado en este estudio, si bien los grados de afección son muy inferiores. En el caso del águila perdicera, el consumo de presas frescas y completas hace improbable que se derive de una deficiencia como tal.

El magnesio es otro elemento fundamental en la formación de la cáscara. Su deficiencia se ha constatado produce un descenso significativo en el grosor de la cáscara (Wanddell et al, 1990).

Los estudios de estos autores demuestran que el magnesio se encuentra fundamentalmente en aquellas zonas de mayor presencia de materia orgánica de la cáscara. De forma adicional, existen sistemas de transporte de calcio dependientes o independientes de magnesio. En función de este balance en cada especie, las cáscaras pueden verse afectadas en mayor o menor medida ante una hipomagnesemia. De forma inversa, aquellas especies más susceptibles a los efectos de DDE serían resistentes a este fenómeno, ya que el transporte de calcio en las mismas tendría lugar independientemente de la presencia de magnesio. Asumiendo estas premisas, la disminución de la capa de empalizada asociada a la población española estaría ligada a la desaparición de la porción más interna de esta capa presente en las poblaciones portuguesas.

La disposición de esta capa hace pensar que pueda tener una mayor concentración de materia orgánica, y por tanto de magnesio. Asumiendo esta hipótesis, el águila perdicera sería en principio poco sensible a los efectos del DDE. Las alteraciones observadas en la ultraestructura de la cáscara estarían mas ligadas a alteraciones en la matriz de la cáscara y de las membranas, en virtud de la correlación de este fenómeno con el de multinucleación y fusión de fibras. No obstante, estas hipotesis requerirían de su confirmación mediante análisis químicos. Si es así, la posible causa primaria de la deficiencia de estos minerales es desconocida hasta la fecha.

El exceso o carencia de un número importante de vitaminas da lugar a alteraciones de la cáscara. Creemos que en el caso de aves salvajes predadoras es ciertamente difícil que estas carencias aparezcan como resultado de problemas en la dieta.

De nuestros estudios realizados en rapaces cautivas se desprende que, tal y como sucede en las aves domésticas (Romanoff y Romanoff, 1949), el tamaño del huevo es directamente proporcional al tamaño de la hembra dentro de la misma especie. Esto es especialmente cierto en aves rapaces como hemos podido comprobar existiendo una correlación con un grado muy elevado de significación.

La relación entre peso de la hembra y tamaño del huevo es lineal en las aves adultas, pero puede no serlo en aves jóvenes durante el periodo de crecimiento (Marble, 1930).

II.1.3. Grado de estrés de la pareja durante la epoca de puesta

Es ciertamente complejo medir el nivel de estrés al que se encuentra sometido un individuo salvaje de forma no invasiva, por lo que las apreciaciones han de tomarse con cautela.

El estres puede dar lugar a importantes alteraciones en la forma de la cáscara. Estas alteraciones en la gallina incluyen: huevos con formas anormales, cubiertas de calcio amorfo, huevos rosados o con aspecto polvoriento (Hughes et

al, 1986). La administración de adrenalina subcutánea dio lugar a retenciones de huevo y a un aumento de la aparición de anomalías proporcional a la dosis.

Parece claro que en muchos casos grados de estrés elevados dan lugar a una disminución en la producción de huevos. Sin embargo, grados menores de estrés pueden traducirse en retrasos en la ovoposición, los cuales se relacionan con la presencia posterior de cubiertas anormales de la cáscara. En el águila perdicera no hemos encontrado ninguna de estas formas anormales lo que podría traducirse en niveles bajos de estrés. En cautividad el estrés puntual da lugar a retraso en la ovoposición en esta especie e incluso al cese de la puesta, sin embargo tampoco se han observado formas anormales salvo huevos en fáfara.

En aves domésticas, factores como el ayuno o el calor excesivo dan lugar a estrés, lo que se traduce en mamilas redondeadas y orientación anormal de las columnas de la capa de empalizada. El adelgazamiento de la cáscara se ha citado pueda estar relacionado no sólo con la alteración del equilibrio ácido-base, sino además con una disminución de la capacidad de las células duodenales para el transporte del calcio (Mahmoud, 1996).

II. 2. FACTORES GEOGRÁFICOS Y CLIMATOLÓGICOS

II.2.1. Núcleo poblacional

Los resultados estadísticos derivados de los ANOVA multifactoriales, muestran diferencias significativas entre las poblaciones evaluadas en el presente estudio. Estas diferencias constatadas son de gran interés ya que varias de ellas se relacionan directamente con el grosor de la capa de empalizada, que es la que contribuye en gran medida al grosor total de la cáscara.

Los resultados ponen de manifiesto que, en la población española, esta capa se encuentra ciertamente alterada en comparación con las otras poblaciones. Estas alteraciones severas se traducen en disminuciones importantes del grosor, acompañadas de descensos importantes en los valores de otros parámetros con lo

que se correlaciona significativamente. Entre ellos figura la reducción drástica en el número de poros o del número de vesículas en la capa de empalizada.

Las reducciones en el espesor de esta capa en la población española fue de entre un 25,6% y un 30,45 en comparación con las poblaciones del Algarve y Arribes de Duero. Estos valores son muy significativos, y superiores a los referidos incluso en la literatura como causantes de descensos en las tasas de eclosión en otras rapaces (Ratcliffe, 1970; Stickel, 1975; Newton 1979) como consecuencia de niveles elevados de DDE. Estas diferencias doblan las encontradas entre huevos antiguos y modernos en el águila imperial (*Aquila adalberti*), siendo estas del 12.3% para la capa de empalizada (Gonzalez e Hiraldo, 1988). En esta especie, sin embargo, las mayores diferencias se produjeron en la capa mamilar llegando a un 15.5% de disminución.

Las características de las diferencias encontradas entre las poblaciones portuguesas y las españolas apuntan a la posibilidad de que se deban a niveles elevados de pesticidas organoclorados.

Diferentes autores no han encontrado variaciones importantes en otras características de la cáscara como el número de poros, el área de los mismos o el número de conos mamilares (Cooke, 1979; Board y Perrot, 1979; Gonzalez e Hiraldo, 1988), mientras que estas variaciones si aparecen en el águila perdicera. Este fenómeno puede deberse a diferencias específicas, o bien a niveles superiores de organoclorados en la población castellano-manchega, lo que se relacionaría con la mayor reducción en el espesor de la capa de empalizada encontrada. Es posible que dichas alteraciones estén ligadas a la acción sinérgica de organoclorados y PCBs, capaces de producir disminuciones significativas del grosor total de la cáscara en aves rapaces (Lowe y Stendell, 1991).

Un 64% de las muestras procedentes de la población portuguesa mostraron superficies de cutícula de aspecto irregular, mientras que esta tendencia se invirtió en la población española. El hecho de que las cutículas lisas se relacionen significativamente con una disminución media del 16.6% en el grosor de la capa

mamilar, pueden apoyar la hipótesis del posible efecto de determinados pesticidas sobre la cáscara en el águila perdicera en nuestro país.

II.2.2. Temperatura durante los días de puesta

La temperatura se ha demostrado experimentalmente que puede influir sobre el peso del huevo y el tamaño en la gallina (Heywang, 1946). Temperaturas por encima de 21 grados, tienen un efecto negativo disminuyendo el tamaño del huevo. Por el contrario, temperaturas bajas no parecen influenciar poderosamente en este parámetro.

Las aves salvajes parecen requerir varios días de temperaturas moderadas para facilitar la formación del huevo (Kendeigh, 1941). Con frecuencia hemos observado que las rapaces ajustan su puesta a periodos benignos dentro de unos márgenes que varían poco entre años consecutivos. En este sentido, la población del Algarve, con temperaturas más benignas, puede superar los límites expuestos. En este sentido, cabría esperar que aquellos huevos puestos a finales de la estación reproductiva puedan haber estado condicionados por la existencia de temperaturas elevadas. Del mismo modo, se ha descrito que elevaciones de la temperatura de 20°C a 32.5°C dan lugar a reducciones significativas en el grosor de la cáscara (Warren y Schnepfe, 1940).

II.2.3. Altitud del área de cría

La ausencia de diferencias significativas en el número de poros entre muestras correspondientes a parejas cuyos habitats difieren en unos 800 m de altitud, sugiere que este rango no es suficiente para producir alteraciones notables en el águila perdicera.

II.3. FACTORES GENÉTICOS E INDIVIDUALES

Existe evidencia de que un número limitado de genes intervienen en la heredabilidad de la forma del huevo (Marble, 1943). El aspecto más o menos rugoso de la cutícula parece heredarse en un 72% de la descendencia.

El grosor de la cáscara es una manifestación del metabolismo del calcio y su habilidad para su asimilación y excreción. El grosor de la cáscara en el pollo parece estar de algún modo bajo un cierto control hereditario si bien estos mecanismos no se conocen con precisión (Romanoff y Romanoff, 1949).

La dificultad de ciertas líneas para mejorar el grosor de la cáscara, incluso en las condiciones nutricionales y ambientales más favorables, parece ir en favor de esta hipótesis.

De nuevo existe una gran controversia en cuanto al grado de variación individual y sus repercusiones en la interpretación de fenómenos. Esta variación depende en gran medida del parámetro elegido en referencia a la estructura del huevo. En cuanto al grosor de la cáscara, la variación entre individuos es grande en especies domésticas, posiblemente debido a su domesticación.

En especies salvajes, esta variación se reduce aunque sigue siendo amplia (Romanoff y Romanoff, 1949). Sin embargo, entre los huevos de una misma hembra la variación es limitada y el grosor tiende a ser muy constante. Los resultados del presente estudio apuntan en esta dirección, siendo mínima la variación en el grosor total y de cada capa en esta especie.

En contradicción con lo argumentado por otros autores para otras especies, el número de poros es ciertamente variable en los huevos de un mismo individuo correspondientes a años consecutivos. Su aumento no se correlaciona con cambios importantes en los contenidos de pesticidas organoclorados. Igualmente, existen diferencias importantes en el área total de poros.

II.4. FACTORES INMUNOLÓGICOS E INFECCIOSOS

En 1949, Romanoff y Romanoff describen con acierto: "La actividad reproductiva de la hembra esta influenciada de forma incuestionable por su condición física. Alteraciones fisiológicas debidas a enfermedades pueden alterar el tamaño del huevo, incluso antes de que éstas sean evidentes....". En efecto, la presencia de patologías da lugar en muchos casos a una disminución del tamaño del huevo, y no a un cese de la puesta, en la mayoría de las afecciones crónicas.

Infecciones en el útero pueden dar lugar a huevos anormales en la forma, pero también a huevos de tamaño inferior al normal.

La presencia de patologías en los pollos no se relacionó con ninguna de las variables cuantitativas o subjetivas investigadas en el presente estudio. Este hecho puede ser cierto, o bien deberse a la inesactitud del modelo asumido. Es posible que el estado sanitario de los pollos no refleje el de sus progenitores.

En las aves rapaces adultas, la mayoría de las enfermedades son procesos de tipo crónico que dan lugar a pérdida de condición del ave. Previo a la puesta, las aves rapaces requieren un aumento considerable de peso. Cabe la posibilidad de que las enfermedades más comunes cursen más frecuentemente con una inhibición de la puesta, que con alteraciones morfológicas de la cáscara. Estos aspectos requieren de investigaciones más profundas mediante métodos no invasivos.

III. DESCRIPCIÓN DE ALTERACIONES ULTRA ESTRUCTURALES.

1. Cutícula.

- *Presencia o ausencia de cutícula.*

La presencia de extensiones superiores de cutícula se correlacionó significativamente con huevos más grandes. Este aspecto resulta fundamental ya que la presencia de vesículas se correlaciona con cutículas deficientes. Es posible argumentar que, si las formaciones globulares son bacterias, la presencia de procesos infecciosos pueda dar lugar a un tamaño inferior del huevo. La disminución de la cutícula en este caso podría haber contribuido a la penetración de ciertas bacterias en la cloaca durante la ovoposición.

Es necesario hacer notar que el tamaño del huevo depende de múltiples factores. Entre los más importantes figuran el tamaño de la hembra y su edad (Romanoff y Romanoff, 1949). En el primer caso, las aves de la población del Algarve parecen significativamente mayores en tamaño a la población española. No obstante, cuando esta variación se elimina, la tendencia continúa, lo que demuestra que existen otros factores implicados.

- *Presencia o no de estructuras especiales: esferolitos, vesículas, material en la entrada de los poros, y fracturas radiales.*

El único caso en el que se ha detectado la presencia de esferolitos se ha producido en la zona de Almadén coincidiendo con la presencia de niveles elevados de mercurio suficientes para producir muerte embrionaria. Este hallazgo sugiere que este metal pueda ser uno de los responsables directos de algunas de las alteraciones observadas. Dada la relación sugerida entre la presencia de esferolitos y de material obstruyendo los poros, es posible teorizar sobre la posible relación de estas anomalías con la muerte embrionaria en estadios intermedios del desarrollo.

2.Capa de cristalización externa

- *Grado de cristalización.*

La relación de este parámetro con la resistencia de la cáscara a su fractura ha sido sugerida por diversos autores, si bien persiste la controversia. A falta de la realización de las pruebas físicas de resistencia a la presión, si es cierto que el

grado de cristalización en esta capa se relaciona significativamente con el mismo parámetro en la capa de empalizada. Dado que esta última, por sus dimensiones e s de una importancia capital en el águila perdicera, sus anomalías resultan de gran importancia.

Se han observado casos en los que la disminución del grado de cristalización de esta capa se ha correspondido con descensos en el grosor total de la cáscara lo que soportaría esta hipótesis.

3. Capa de empalizada

- *Grado de cristalización.*

Salvo excepciones anecdóticas, la cristalización en esta capa no parece ser un problema generalizado en ninguna de las poblaciones estudiadas. Incluso en las cáscaras afectadas por fenómenos como la presencia de vesículas, el grado de cristalización no se ha visto afectado de forma significativa.

4. Capa mamilar.

- *Grado de multinucleación.*

De forma opuesta a lo descrito para la cristalización, los fenómenos de multinucleación son frecuentes. Los resultados apuntan a su estrecha relación con niveles elevados de mercurio y otros compuestos tóxicos. Los estudios ultraestructurales sugieren que su presencia puede contribuir de forma notable al debilitamiento y fragilidad de la cáscara. Su presencia aparece claramente ligada a alteraciones de las membranas testáceas lo que sugiere la alteración de la síntesis de proteoglicanos como posible causa primaria de ambos fenómenos. Los cuerpos mamilares son los pilares sobre los que se estructura el resto de capas de la cáscara por lo que alteraciones a este nivel pueden tener consecuencias nefastas.

- *Forma de las mamilas.*

La presencia de mamilas planas es más frecuente en huevos eclosionados o con desarrollo embrionario llevado a término. Este fenómeno podría estar

relacionado con el hecho constatado de la absorción de calcio procedente de la superficie interna de estas estructuras durante el último estadio del desarrollo embrionario. Este extremo puede resultar de aplicación para el diagnóstico del desarrollo embrionario en restos de cáscara o huevos depredados.

5. Membranas testáceas

- *Distribución de fibras.*

La presencia de vesículas en las fibras corresponde con contaminaciones bacterianas. El origen y vía de entrada es desconocido, si bien pudieran proceder de una contaminación exógena transcurrido el periodo de incubación. No obstante, dado que el tratamiento de las muestras ha sido idéntico, unido a la correlación con la presencia de estas estructuras imbricadas en la capa de empalizada en los casos más severos, podría indicar la naturaleza infecciosa del fenómeno. En este caso podría sugerirse una salpingitis como causa primaria. De ser cierta esta hipótesis, su incidencia en la población del Algarve sería muy elevada, extremo que es necesario investigar.

IV. TÓXICOS AMBIENTALES EN CONTENIDOS DE HUEVO COMO BIOINDICADORES

IV.1. ANÁLISIS TOXICOLÓGICO

IV.1.1. Organoclorados

De entre los residuos de organoclorados determinados en el presente estudio, el DDE fue el que se encontró en niveles superiores, en consonancia con lo referido en otros estudios realizados en el águila imperial ibérica (Gonzalez e Hiraldo, 1988). Los niveles oscilaron entre 0.16 y 2.96 µg/g de materia húmeda,

con una media de $0.89 \pm 0.67 \mu\text{g/g}$. Estos valores son ligeramente inferiores a los registrados para el águila imperial (Gonzalez e Hiraldo, 1988), e inferiores a los hallados en otras especies de aves de presa que aves como parte de su dieta (Reichel et al, 1969, Ratcliffe, 1970; Newton, 1979).

El grado de toxicidad de estos compuestos varía notablemente con diversos factores entre los que se incluyen la especie, la edad, el estado fisiológico, el estrés, la condición física,...etc. La variación interespecífica en la susceptibilidad a este organoclorado es importante a la hora de evaluar los resultados. Niveles entorno a $4.2 \mu\text{g/g}$ de materia húmeda en el águila pescadora se han asociado a una disminución del 15% en el grosor total de la cáscara (Wiemeyer et al, 1988). Sin embargo, niveles cuatro veces superiores ($16 \mu\text{g/g}$) se han asociado en el águila calva con idénticas reducciones en el grosor de la cáscara (Wiemeyer et al, 1993).

Las aves que experimentan mayormente los efectos de estos compuestos son las más longevas, situadas en la cúspide de la pirámide ecológica. El águila perdicera se enmarca bien dentro de éstas características.

Los resultados han de tomarse con cierta cautela. En patos intoxicados con Dicifol (acaricida estructuralmente similar al DDE) o DDE, se observó una disminución en la resistencia de la cáscara y su grosor a dosis mínimas en el caso del DDE ($3 \mu\text{g/g}$). Los efectos comenzaron a aparecer de forma inmediata en el caso de ambos compuestos. Hay que hacer notar que la disminución en la calidad de la cáscara se produjo incluso con niveles de DDE en contenido de huevo entorno a $1.4 \mu\text{g/g}$. Esta especie es mucho menos sensible a los efectos de DDE que las rapaces. De hecho Wiemeyer et al (1988), han demostrado que los mismos efectos se producen en cárbos americanos con dosis diez veces inferiores.

En el presente estudio se han constatado disminuciones muy importantes del grosor de la capa de empalizada afectando a la población española, que sin embargo se han traducido en un descenso del grosor total no superior al 5%

cuando se compara con la población del Algarve. Los niveles superiores de DDE detectados en la primera pueden estar relacionados con este fenómeno.

Se desconoce la susceptibilidad de esta especie a los organoclorados, si bien se ha demostrado que rapaces como el cernícalo americano son mucho más susceptibles que el resto de las especies examinadas (Fry et al, 1988). Entre especies de aves rapaces, el halcón de las praderas (*Falco mexicanus*) es más susceptible al DDE que el halcón peregrino. Niveles entorno a 2 µg/g pueden afectar a la primera, mientras que en el halcón peregrino son necesarios niveles entre 15 y 20 µg/g (Jarman et al, 1996).

Los niveles de Dieldrin en el presente estudio variaron entre la ausencia de niveles detectables y 0.6 µg/g en materia húmeda, con una media de 0.06 µg/g. Estos valores pueden clasificarse como bajos en comparación con los descritos como causantes de infertilidad en el águila real (1 µg/g) (Lockie et al, 1969).

Los niveles de dieldrin encontrados en el águila perdicera son considerablemente superiores a los descritos para el águila imperial (Gonzalez e Hiraldo, 1988). Es necesario considerar aspectos importantes como la diferentes susceptibilidad interespecífica. Niveles iguales o superiores a 5 µg/g de materia húmeda en cerebro se han constatado como letales (Stickel, 1969). De hecho, el deceso de las poblaciones de halcon peregrino y otras rapaces en Estados Unidos y Europa, en las pasadas décadas, ha sido ciertamente discutido. Hoy se cree que mortalidades directas debidas al uso de dieldrin junto con otros ciclodienos contribuyeron de forma importante (Ratcliffe, 1988; Newton y Hass, 1984).

Los niveles de isómeros del hepatacloro ciclohexano encontrados en las muestras analizados son ínfimos, no siendo detectados por las técnicas empleadas en un gran número de muestras. El gamma isomero o lindano tan solo se encontró en tres muestras. La DL50 de este producto no se ha estudiado en especies afines; sin embargo, niveles de 10 µg/g en huevos de faisanes no dieron lugar a alteraciones en las tasas de eclosión (Ash y Taylor, 1964).

El uso de lindano se ha relacionado con un descenso en los parámetros reproductivos del ganso del canadá y el cernícalo americano en el área de Oregon y Washington, efectos que desaparecieron al sustituir este pesticida por heptaclor (Henny et al, 1984).

Los niveles de HCB en las muestras examinadas son ciertamente reducidos. Niveles medios de 0.75 µg/g se han sugerido como posibles causantes de mortalidad embrionaria en el halcón de las praderas (*Falco mexicanus*) (Jarman et al, 1996). En gaviotas, niveles entorno a 1.5 µg/g dan lugar a mortalidades embrionarias del 21% (Boersma et al, 1986). En el águila perdicera los niveles fueron aproximadamente veinte veces inferiores a los referidos para el halcón de las praderas, considerado como muy sensible a los efectos de los organoclorados. Estos resultados indican que posiblemente el HCB, no este implicado en las alteraciones ultraestructurales detectadas en este estudio.

IV.1.2. Bifenilos policlorados

Los niveles de bifenilos policlorados determinados en este estudio son bajos. No obstante, resulta difícil conocer las posibles implicaciones de estos compuestos y su relación con otros tóxicos.

IV.1.3. Mercurio.

El mercurio se ha destacado como el metal más relevante causante de disminución de las poblaciones de aves rapaces (Newton, 1979). Los niveles de mercurio detectados en las muestras examinadas, varían en función de la población y la localización. Los valores medios fueron aproximadamente el doble de los referidos para el águila imperial en 1988 (Gonzalez e Hiraldo, 1988).

Los niveles medios en el águila perdicera fueron similares a los descritos en tejidos de acuáticas en el Parque Nacional de Doñana (Gonzalez et al, 1983), sin embargo los niveles mínimos fueron inferiores en el águila perdicera. Cernícalos comunes (*Falco tinnunculus*), intoxicados mediante consumo de

ratones contaminados con metilmercurio, mostraron niveles letales que variaron entre 49 y 122 ($\mu\text{g/g ww}$) en hígado, 39 a 92 ($\mu\text{g/g ww}$) en riñón, o 20 a 33 ($\mu\text{g/g ww}$) en cerebro (Koeman et al, 1971). En el ratonero cola roja americano, niveles en hígado entre 18.8 y 20 ($\mu\text{g/g ww}$) fueron clasificados como letales. Estos niveles se elevan hasta 121 ($\mu\text{g/g ww}$) en el caso del azor (*Accipiter gentilis*). Como se puede apreciar, existen diferencias interespecie en la susceptibilidad a la intoxicación por este tipo de compuestos, incluso entre las aves rapaces. Los embriones y pollos son más susceptibles que las aves adultas, y niveles entre 5.46 y 7.18 $\mu\text{g/g ww}$ se han referido como causantes de mortalidad embrionaria y neonatal en patos (Heinz y Locke, 1976).

Niveles entorno a 3 $\mu\text{g/g}$ de materia húmeda se ha comprobado que producen lesiones en el cerebro características de esta intoxicación en pollos de pato negro (*Anas rubripes*). Los niveles detectados en algunos huevos en el presente estudio se sitúan entre 1.2 y 1.7, la mitad de los referidos como letales en patos. De nuevo se desconoce la susceptibilidad del águila perdicera a la intoxicación por este tipo de compuestos, por lo que la interpretación de estos resultados es arriesgada.

Los niveles constatados parecen suficientemente elevados como para dar lugar a mortalidad embrionaria o infertilidad. De hecho, los niveles máximos encontrados corresponden a huevos infértiles y fértiles en los que los embriones fallecieron a edades entre 30 y 35 días. Desafortunadamente el estado de autólisis de las muestras impidió la realización de estudios histopatológicos para la detección de las lesiones histopatológicas típicas de la intoxicación.

El diagnóstico de este tipo de intoxicaciones es complejo ya que determinados compuestos pueden disminuir los efectos tóxicos del mercurio. Se ha comprobado que los niveles de selenio y zinc protegen frente a la intoxicación por mercurio (Norheim, 1987). Estos metales no fueron analizados en el presente estudio, esperando acometer estos análisis en un futuro próximo. Otro aspecto que

complica notablemente la interpretación de los resultados es la cantidad de mercurio que se encuentra como metilmercurio (la forma más tóxica), ya que la toxicidad final varía notablemente en función de este aspecto.

IV.2. TOXICOS Y ASPECTOS ULTRAESTRUCTURALES DE LA CÁSCARA Y MEMBRANAS TESTÁCEAS

El efecto modificador de la cáscara de los PCBs es menos potente que el producido por el DDE. De hecho, en cernícalos americanos (*Falco sparverius*) recibiendo dosis de 10 µg/g de Aroclor 1254 en la dieta, el índice de la cascara no se vió afectado (Lincer, 1972). Sin embargo, el mismo autor encontró reducciones significativamente superiores en el índice de grosor de la cáscara en cernícalos que recibieron una combinacion de Aroclor y DDE, que aquellos que recibieron exclusivamente DDE. Este hallazgo muestra la dificultad de separar estos efectos en datos correspondientes a especies salvajes.

En el presente estudio no se observaron reducciones significativas del grosor de la cáscara en huevos con niveles similares de DDE pero difiriendo en los niveles de PCBs. Es necesario tener en cuenta que existen un gran número de factores que pueden influir en el resultado final incluyendo diferencias individuales. Tan solo un aumento de la irregularidad en la distribución de las fibras de la membrana externa se ha correlacionado con niveles superiores de PCBs en el presente estudio.

Un importante número de estudios experimentales han revelado que el metil mercurio puede interferir en la formación de la cáscara (Heinz, 1979; Lundholm, 1987b). Este metal, al igual que el cadmio y el aluminio parecen dar lugar a una disminución del grosor de la cáscara (Lundholm y Mathson, 1986).

En el caso del mercurio, el mecanismo no es bien conocido, si bien las investigaciones realizadas por Lundholm indican que sus efectos sobre el metabolismo del calcio y la síntesis de prostaglandinas varían en función del

compuesto de mercurio y la dosis. En cualquier caso, dichos efectos son diferentes a los producidos por el DDE. El metil mercurio estimula la síntesis de $\text{PGF}_{2\alpha}$ y PGE_2 en la mucosa de la glándula de la cáscara mientras que el cloruro de mercurio solo estimula la síntesis de la segunda.

La administración reiterada de metil mercurio reduce la disponibilidad de calcio en la glándula coquiliaria. Esto es posible que se deba a una disminución de la absorción del calcio a nivel intestinal o de la movilización de este a partir del hueso medular (Lundholm, 1995). Las reducciones en el grosor de la cáscara en patos intoxicados con 1 mg de metil mercurio alcanzaron el 13% en administraciones crónicas (50 días). Esta reducción, contrariamente a lo que sucede con el DDE, también se produjo en pollos (Lundholm, 1995).

En el caso de administraciones crónicas de metil mercurio, aparecen defectos en la cáscara consistentes en superficie rugosa con indentaciones, sin que se alteren los niveles de calcio y prostaglandinas en la mucosa de la glándula de la cáscara. En el caso del águila perdicera no se han detectado alteraciones significativas del grosor total o de cada una de las capas de la cáscara en relación con los niveles de mercurio detectados en el presente estudio. Tampoco se observó excesiva rugosidad en la cáscara. Por el contrario, se apreció un aumento significativo del área porosa y el número de poros, no existiendo información sobre este aspecto en la bibliografía.

Las reducciones significativas en el índice de la cáscara descritas por otros autores están relacionadas con la disminución en el grosor total de la cáscara, si bien no es descartable que el aumento en la porosidad pueda estar contribuyendo a la misma.

Al margen de los efectos sobre el calcio y la cáscara en particular, el mercurio da lugar a una reducción en el tamaño de la puesta e incluso a un cese de la misma (Hill y Shaffner, 1976). Clark et al (1985) han apuntado que el metil mercurio disminuye los niveles de estrógenos y progesterona en plasma. En este sentido, los niveles encontrados en contenido de huevos reflejan de algún modo la

posible problemática en los adultos. En estos últimos, el mercurio podría estar ejerciendo una acción importante sobre el ciclo reproductor como consecuencia de su efecto sobre estas hormonas.

Las especies de aves piscívoras tienen un mayor riesgo de alcanzar niveles importantes de mercurio. En el caso del águila imperial, se ha observado que las poblaciones más ornitófagas poseen niveles superiores a las demás, si bien las diferencias no son significativas (Delives, 1978). Esta podría ser una de las explicaciones para un mayor acumulo de este metal en el águila perdicera en comparación con el águila imperial, ya que la dieta de la primera cubre un espectro más amplio de presas, incluyendo aves.

V. DOCUMENTACIÓN DE ESTADÍOS EMBRIONARIOS Y SU RELACIÓN CON PARÁMETROS ULTRAESTRUCTURALES

V.1. CAUSAS DE POSIBLES ANOMALÍAS EN EL DESARROLLO EMBRIONARIO DETECTADAS EN EL ÁGUILA PERDICERA

El ambiente que rodea al embrión influye notablemente en su desarrollo. El embrión requiere un intercambio gaseoso que se realiza a través de los poros de la cáscara, por lo que alteraciones en estos parámetros pueden influir en el desarrollo embrionario. No obstante, Simkiss (1980) ha sugerido que el embrión es capaz de adaptarse a estos cambios.

El desarrollo embrionario puede verse afectado directa o indirectamente por diferentes factores incluyendo tóxicos ambientales, agentes infecciosos, o factores nutricionales. Estos pueden afectar directamente al embrión como consecuencia de su presencia en el interior del huevo y por tanto en las fuentes de alimentación del

embrión en desarrollo, o bien de forma indirecta como consecuencia de la alteración de la estructura de la cáscara.

El primero de los casos anómalos examinados en este estudio consistió en un embrión que presentó braquipnata y asimetría afectando a las alas, apareciendo el ala derecha con un mayor desarrollo que el miembro contrario. El peso del embrión es similar al peso de referencia para un embrión de 28 días, sin embargo, la medida del antebrazo es significativamente inferior (22%) a la normal para esa edad. Del mismo modo, las dimensiones de la cabeza fueron muy superiores a las habituales. La causa es desconocida, si bien el acúmulo de ciertos tóxicos como el mercurio (Heinz y Locke, 1976) se ha referido como muy embriotoxico en patos a concentraciones tisulares entre 5.46 y 7.48 ppm.

Entre los tóxicos habituales, el selenio destaca por su enorme poder teratogénico causando mortalidad embrionaria y anomalías en el desarrollo (Heinz et al, 1989). La reducción en la longitud de los miembros se ha descrito en intoxicaciones por Aldicarb (Chambers et al, 1989) cuando este se aplica o inyecta directamente en el huevo, habiéndose referido reducciones de un 8% en la longitud del tarsometatarso en comparación con los controles. En el caso detectado en la población de águila perdicera la longitud del antebrazo se redujo en un 11%.

En los otros tres casos los hallazgos de necropsia incluyen la presencia de petequias, hemorragias, serositis, ...etc, todos ellos apuntan a la posibilidad de que se trate de casos de penetración de agentes infecciosos en el huevo. En los tres casos se aisló *E. coli* acompañado, en dos de ellos, por *Pseudomonas* spp y *Proteus* spp. En ninguno de los casos se aisló *Salmonella* spp.

Dado el grado de autólisis observado y el tiempo transcurrido hasta la recolección de los huevos, los hallazgos microbiológicos son sólo indicativos, y no es posible discernir si fue alguno de estos microorganismos el causante del proceso. La presencia de caquecía y petequias en el embrión se correlacionan positivamente con los hallazgos habituales en infecciones por *E. coli*.

Las muertes embrinarias ocasionadas por agentes infecciosos suelen acontecer durante el último periodo de desarrollo del embrión (Clubb y Philips, 1992). Determinadas bacterias pueden penetrar en el huevo a través de los poros de la cáscara, ya que su diámetro es inferior al de estos, y atraviesan fácilmente la membrana. Este paso se ve facilitado por la presencia de agua en la cáscara y los cambios de temperatura. Algunos autores han sugerido que la calidad de la cáscara, medida en función de la gravedad específica, es un factor importante a la hora de limitar la contaminación bacteriana; argumentando que los huevos con menor gravedad específica son más susceptibles a la penetración (Sauter y Peterson, 1974).

En 1998, Berrang et al demostraron que, en el caso de Salmonella, no existe relación entre las posibilidades de penetración y la gravidez específica, la conductancia o el peso del huevo. Recientemente, los estudios del mismo autor indican que tras el análisis de membranas testáceas no se ha encontrado relación entre el área interfibrilar de estas y la posibilidad de penetración de la Salmonella.

En los casos de afección del embrión en el águila perdicera, estos parámetros permanecieron dentro de los rangos habituales para la especie. Esto sugiere que, tal y como se ha descrito en la gallina, existen otros factores implicados en este fenómeno. En todos los huevos que presentaron esta problemática la presencia de cutícula fue anecdótica, sugiriendo que la reducción en el grosor de la misma pueda ser un factor condicionante.

Las vesículas detectadas fundamentalmente en las membranas testáceas externas e internas, por su morfología y tamaño es posible que se trate de bacterias. Estas se encuentran presentes en todos los casos en los que se ha producido muerte embrionaria. No obstante, cabe la posibilidad de que la presencia de estas sea producto de una contaminación posterior al periodo de incubación.

El estudio estadístico oportuno mediante el rango de correlaciones de Spearman y Pearson, refiere una correlación significativa ($p=0.04$) entre la

presencia de vesículas y la muerte embrionaria. Sin embargo, no se relaciona con otras variables como el grado de cristalización, la distribución de las fibras, o la distribución, forma y tamaño de los cuerpos mamilares.

V.2. DESARROLLO EMBRIONARIO Y PARÁMETROS ULTRAESTRUCTURALES DE LA CÁSCARA

La correlación negativa existente entre el número de vesículas en las membranas testáceas y la edad alcanzada por el embrión sugiere pueden ser un factor limitante en el desarrollo del mismo. Con independencia de la naturaleza y composición de estas formaciones, su presencia o su causa primaria pueden incidir de forma negativa en el desarrollo del embrión. Las muertes embrionarias por contaminaciones bacterianas suelen suceder en los últimos estadios de desarrollo del embrión, si bien pueden acontecer durante todo el desarrollo del mismo.

La variación en el periodo de incubación se ha demostrado que es heredable en el pollo (Crittenden and Bohren, 1961). Sin embargo, la influencia genética en el desarrollo embrionario es más difícil de demostrar. En general el descenso en la tasa relativa de crecimiento de un embrión en función del incremento en su tamaño es una expresión del desarrollo (Ricklefs, 1987).

En el caso del águila perdicera, los embriones procedentes de huevos más grandes alcanzaron también pesos superiores tras los mismos días de incubación. En estos casos se observó que en los embriones de menor peso, sin embargo poseen extremidades más largas lo que indica que su desarrollo es posiblemente más rápido. Este fenómeno se ha observado en estadios muy primarios lo que puede indicar que el embrión es capaz de modificar su crecimiento en función del ambiente que le rodea como ha sugerido Ricklefs (1987).

La ausencia de cutícula puede también estar relacionada con la ausencia de pigmento.

En ausencia de cutícula las bacterias pueden penetrar desde la superficie de la cáscara con independencia del número de poros dando lugar a modificaciones estructurales en la capa de los cuerpos mamilares (Nascimento et al, 1992).

Factores distintos a la conductividad y gravedad específica del huevo están implicados en la penetración de salmonella a través de la cáscara (Berrang et al, 1998). Del mismo modo, la densidad y el espacio entre fibras de la membrana externa no están relacionados con la capacidad de penetración de la Salmonella.

V.3. TIEMPO DE INCUBACIÓN Y DESARROLLO EMBRIONARIO

La cáscara es una importante fuente de calcio para el embrión en formación (Romanoff y Romanoff, 1949). En la gallina el grosor de la cáscara disminuye un 5% como consecuencia de la incubación (Simkiss, 1967). En la codorniz este porcentaje aumenta hasta el 7%, mientras que en algunas especies silvestres como el pelícano (*Pelecanus occidentalis*) (Anderson y Hickey, 1970), o diversas especies de garzas (Ohlendorf et al, 1979; Laporte, 1982) no se han encontrado diferencias significativas.

En aves rapaces se han registrado diferencias importantes: en la lechuza tanto el grosor como el índice de grosor son significativamente menores en huevos incubados. En el cernícalo americano hay diferencias significativas en el grosor de diferentes estadios de desarrollo, pero el índice no varía. En el "screech owl" (*Otus asio*) americano, ninguno de los dos parámetros varía significativamente.

En el caso del águila perdicera tampoco se encontraron variaciones significativas. Hoy sabemos que en general las especies precociales no sólo tienen un espesor superior de la cáscara, sino que además, la disminución del grosor de la cáscara es muy superior. Por el contrario, en las especies altriciales como el águila perdicera no ocurre de la misma manera. Las diferencias con las otras rapaces quizá puedan deberse al tamaño.

Es importante reseñar que si bien la reducción no es significativa, si se aprecia un cambio en la morfología de las mamilas en los huevos incubados a término y eclosionados. En estos casos las mamilas aparecen planas con mayor frecuencia indicando las zonas de probable resorción.

CONCLUSIONES

- 1- La cáscara del águila perdicera cuenta con cutícula y áreas de mayor y menor densidad de poros, siendo la superficie de intercambio gaseoso definida por estos inferior en la población Castellana. Ocasionalmente, se observan anomalías como estrías lineales, fracturas radiales y material amorfo obstruyendo los poros.
- 2- La capa de cristalización externa se caracteriza su grosor irregular presentando canales rectilíneos que convergen en cónicos o infundibulares, que desembocan en una capa de empalizada con grosor similar al del águila imperial. La población castellana no presenta banda de estrato amorfo dentro de esta capa a diferencia de la población del Algarve, lo que reduce un 15% el grosor total de la primera.
- 3- La relación entre el grosor de la capa mamilar y el total es inferior en el águila perdicera comparado con el águila imperial y real. El número y área de mamilas y núcleos mamilares es inferior en las poblaciones Castellano-Manchegas y del Duero en comparación con el Algarve portugués, y se relaciona con la presencia de multinucleación.
- 4- El grosor total de las membranas testáceas oscila entre 120 y 141 μm . La distribución de las fibras es regular y bifurcada, no entrelazándose. Se aposicionan en múltiples capas, aumentando su densidad y disminuyendo su grosor según se avanza hacia el interior.
- 5- El mayor grosor total de la cáscara se correlaciona significativamente con el grosor de la capa de cristalización externa, el número total de poros por unidad de superficie y el área total de intercambio gaseoso.

- 6- Cuanto mejor es el grado de cristalización de la capa de cristalización externa mayor es el índice de fertilidad y menor es la incidencia de fracturas radiales.
- 7- El mayor número de mamilas se correlaciona con: el número de poros, el área mamilar al corte, y un mayor diámetro de las fibras de la membrana externa con menor densidad de las mismas.
- 8- Una mayor superficie de los núcleos mamilares se corresponde con un mayor número de mamilas, pero una reducción en el número de fibras. Mayor número de núcleos conlleva un aumento de porosidad y grosor de la cáscara. Por el contrario, la fusión de fibras reduce los núcleos y el grosor de la capa mamilar.
- 9- La distribución irregular de las mamilas se correlaciona significativamente con un menor número de las mismas acompañado por un aumento del área entre ellas.
- 10-La presencia de vesículas en las membranas y capa de empalizada se relaciona significativamente con una mayor irregularidad de las fibras. El espesor medio de la membrana interna es el único parámetro relacionado con la muerte embrionaria por causas infecciosas.
- 11-En el 75% de los casos en los que se detectó material amorfo obstruyendo los poros se constató muerte embrionaria, oscilando entre los 8 y 25 días de desarrollo del embrión.
- 12-Los parámetros con un menor rango de variación en muestras procedentes del mismo individuo son el área mamilar y la distancia entre mamilas.

RESUMEN

En el presente trabajo, hemos investigado las características ultraestructurales normales y alteraciones de la cáscara y membranas testáceas en el huevo del águila perdicera (*Hieraaetus fasciatus*). Hemos establecido la variación de estos parámetros morfológicos de referencia, en función de factores: Fisiológicos, individuales y geográficos. Utilizando el embrión y su desarrollo como bioindicadores, estudiamos el grado de correlación de los hallazgos ecotoxicológicos, con la presencia y magnitud de las alteraciones ultraestructurales, elaborando hipótesis.

Un total de 52 muestras de cáscara correspondientes al periodo 1997-1999, procedentes de tres poblaciones: Castilla - La Mancha, Algarve y Arribes del Duero fueron procesadas y analizadas mediante microscopía electrónica de barrido. Los niveles de mercurio, organoclorados y PCBs en embriones, se determinaron mediante espectrofotometría de absorción atómica de vapor frío en el primer caso, y cromatografía de gases y captura de electrones en los dos últimos.

La superficie externa de la cáscara se caracteriza por una cutícula y áreas de diferente densidad de poros irregularmente distribuidas. El grosor de la capa de cristalización externa es irregular siendo surcada por canales rectilíneos que convergen en infundibulares. El grosor de la capa de empalizada es proporcionalmente superior en comparación con otras especies de águila, ocurriendo lo contrario con la capa mamilar. Las fibras de las membranas testáceas son bifurcadas y no se entrelazan sino que se aposicionan, aumentando en densidad y disminuyendo en grosor según se profundiza.

El aumento del grosor total de la cáscara, se relaciona con un aumento de la superficie total de intercambio gaseoso. La presencia del fenómeno de fusión de fibras da lugar a una disminución de área de nucleación, con un patrón irregular en la distribución de mamilas y un aumento del área entre las mismas. Estos aspectos pueden estar contribuyendo notablemente al aumento de la fragilidad de la cáscara. Los parámetros con menor variación individual son el área mamilar y la distancia entre mamilas.

El estudio comparativo entre poblaciones indica que el número y área de poros, el grosor de la capa de empalizada, y el número y área de mamilas y núcleos son inferiores en la población Castellana, pudiendo estar relacionado con niveles superiores de DDE y Dieldrín. La reducción en longitud y grosor del huevo, se relaciona con contenidos elevados en mercurio presentes en esta población, suficientes para producir muerte embrionaria. Estos niveles se correlacionan con alteraciones en la morfología y distribución de las fibras y de las mamilas, lo que pudiera contribuir a un aumento de la fragilidad de la cáscara. Los

niveles de mercurio y PCBs están relacionados, mientras que el contenido en DDE correlaciona significativamente y negativamente con la fertilidad.

La presencia de vesículas en membranas y capa de empalizada se acompaña de alteraciones morfológicas, pudiendo ser un proceso de etiología bacteriana, de elevada incidencia en la población del Algarve.

SUMMARY

Study focuses on ultrastructural characteristics of Bonelli's eagle (*Hieraetus fasciatus*) eggshell and membranes, through the establishment of reference values and their variation according to physiological, individual and geographical factors, and the description of morphological abnormalities. The presence and magnitude of the latest have been correlated to toxicological findings using embryo tissues as bioindicators, and hypothesis raised.

A total of 52 eggshell samples, collected from 1997 to 1999 and corresponding to three different populations: Castilla - La Mancha, Algarve y Arribes del Duero were processed and analysed using Scanning Electron Microscopy. Mercury, PCBs and organochlorinated pesticides levels were determined using cold vapour atomic absorption spectrophotometry, and gas chromatography and electron capture respectively.

Areas that differ in pore density are irregularly distributed on the external surface. The external crystalline layer is crossed by perpendicular channels that converge into infundibular. Palisade layer thickness is comparatively superior to other eagle species, while the opposite is observed in the mamillary layer. Fibres are bifurcated and do not cross-link, but get apositioned increasing density and decreasing thickness deeper into the membranes.

Increases in eggshell thickness significantly correlate to increments in gas exchange area. Fusion of fibres may lead to a more fragile eggshell, with a decrease in nucleation area, irregular mamillar distribution, and decreased area. Mamillae area and distance between them are subjected to minimal individual variation.

The Castillian population showed decreased number of pores, palisade thickness, and area and number of mamillae and mamillary knobs, in relation to higher levels of DDE and Dieldrin. Mercury levels, high enough to cause embryo mortality in this population, significantly correlates with decreased egg length and diameter. PCBs and mercury levels positively correlates and could contribute to enhanced fragility through changes of the morphology and distribution of fibres. DDE levels significantly and positively correlate with fertility.

Presence of vesicles located between fibres, and in the palisade layer could be of bacterial origin with a highest incidence in the Algarve population.

BIBLIOGRAFÍA

ALBANIS T.A., HELA D., PAPAKOSTAS G. y GOUTNER V. (1996). Concentration and bioaccumulation of organochlorine pesticide residues in herons and their prey in wetlands of Thermaikos Gulf, Macedonia, Greece. *Sci. Total. Environ.* 182: 11-19.

AL-BATSHAN H.A., SCHEIDELER S.E., BLACK B.L., GARLICH J.D. y ANDERSON K.E. (1994). Duodenal calcium uptake, femur ash, and eggshell quality decline with age and increase following molt. *Poult. Sci.* 73: 1590-1596.

ALONSO K.R., PEDEN-ADAMS M.M., LIU J.Y., CHARBONNEAU C., HENSHEL D. y DICKERSON R.L. (1998). Effects of in ovo exposure to 2,3,7,8-TCDD on F1 generation adult chickens (*Gallus gallus*). *Chemosphere.* 37: 1873-1883.

ANDERSON D.W., JEHL JR. J.R., RISEBROUGH R.W., WOODS JR. L.A., DEWEESE L.R. y EDGECOMB W.G. (1975). Brown pelicans: improved reproduction off the southern California coast. *Science.* 190: 806-808.

ARIAS J.L., CARRINO D.A., FERNANDEZ M.S., RODRIGUEZ J.P., DENNIS J.E. y CAPLAN A.I. (1992). Partial biochemical and immunochemical characterization of avian eggshell extracellular matrices. *Arch. Biochem. Biophys.* 298: 293-302.

ARIAS J.L., CATALDO M., FERNANDEZ M.S. y KESSI E. (1997). Effect of beta-aminopropionitrile on eggshell formation. *Br. Poult. Sci.* 38: 349-354.

AUSTIC R.E. y KESHAVARZ K. (1988). Interaction of dietary calcium and chloride and the influence of monovalent minerals on eggshell quality. *Poult. Sci.* 67: 750-759.

BALNAVE D., EL-KHATIB N.U. y ZHANG D. (1992). Calcium and carbonate supply in the shell gland of hens laying eggs with strong and weak shells and during and after a rest from lay. *Poult. Sci.* 71: 2035-2040.

BALNAVE D. y MUHEEREZA S.K. (1997). Improving eggshell quality at high temperatures with dietary sodium bicarbonate. *Poult. Sci.* 76: 588-593.

BALNAVE D. y ZHANG D. (1993). Research note: responses of laying hens on saline drinking water to dietary supplementation with various zinc compounds. *Poult. Sci.* 72: 603-606.

- BALNAVE D., ZHANG D. y MORENG R.E. (1991). Use of ascorbic acid to prevent the decline in eggshell quality observed with saline drinking water. *Poult. Sci.* 70: 848-852.
- BAR A., VAX E., HUNZIKER W., HALEVY O. y STRIEM S. (1996). The role of gonadal hormones in gene expression of calbindin (Mr 28,000) in the laying hen. *Gen. Endocrinol.* 103:115-122.
- BAR A., ROSENBERG J. y HURWITZ S. (1984). The lack of relationships between vitamin D3 metabolites and calcium-binding protein in the eggshell gland of laying birds. *Comp. Biochem. Physiol.* 78: 75-79.
- BAR A., STRIEM S., MAYEL-AFSHAR S. y LAWSON D.E. (1990). Differential regulation of albindin-D28K mRNA in the intestine and eggshell gland of the laying hen. *J. Mol. Endocrinol.* 4: 93-99.
- BAR A., VAX E. y STRIEM S. (1992). Relationships between calbindin (Mr 28,000) and calcium transport by the eggshell gland. *Comp. Biochem. Physiol. Comp. Physiol.* 101: 845-848.
- BAR A., VAX E. y STRIEM S. (1998). Effects of age at onset of production, light regime and dietary calcium on performance, eggshell traits, duodenal calbindin and cholecalciferol metabolism. *Br. Poult. Sci.* 39: 282-290.
- BEBOUT D.E. y HEMPLEMAN S.C. (1994). Calcium deficient diet acetazolamide and gas exchange characteristics of avian eggshells. *Respir. Physiol.* 95: 11-20.
- BEDNARCZYK M. y ROSINSKI A. (1999). Comparison of egg hatchability and in vitro survival of goose embryos of various origins. *Poult. Sci.* 78: 579-585.
- BENNETT J.K., DOMINGUEZ S.E. y GRIFFIS W.L. (1990). Effects of Dicofol on Mallard eggshell quality. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 19: 907-912.
- BERRANG M.E., FRANK J.F., BUHR R.J., BAILEY J.S. y COX N.A. (1999). Eggshell membrane structure and penetration by *Salmonella typhimurium*. *J. Food Prot.* 62: 73-76.
- BERRANG M.E., FRANK J.F., BUHR R.J., BAILEY J.S., COX N.A. y MAULDIN J. (1998). Eggshell characteristics and penetration by *Salmonella* through the productive life of a broiler breeder flock. *Poult. Sci.* 77: 1446-1450.

- BERRY W.D. y BRAKE J. (1987). Postmolt performance of laying hens molted by high dietary zinc, low dietary sodium, and fasting: egg production and eggshell quality. *Poult. Sci.* 66: 218-226.
- BITMAN J., CECIL H.C., HARRIS S.J. y FRIES G.F. (1969). DDT induces a decrease in eggshell calcium. *Nature*. 224: 44-46.
- BORTLAKOGLU J.T. y HAEGELE K.D. (1991). Comparative aspects on the bioaccumulation, metabolism and toxicity with PCBs. *Comp. Biochem. Physiol.* 100C: 327-338.
- BOSVELD A.T.C., GRADENER J., VAN KAMPEN M., MURK A.J., EVERS E.H.G. y VAN DEN BERG M. (1993). Occurrence and effects of PCBs, PCDDs and PCDFs in hatchlings of the common tern (*Sterna hirundo*). : *Chemosphere*. 27: 419-427.
- BOWERMAN W.W., GIESY J.P. BEST D.A. y KRAMER V.J. (1995). A review of factors affecting productivity in bald eagles in the Great Lakes region: implications for recovery. *Environ. Health Perspect.* 103 Suppl 4: 51-59.
- BRANTON S.L. y DEATON J.W. (1985). Egg production, egg weight, eggshell strength, and mortality in three strains of commercial layers vaccinated with F strain *Mycoplasma gallisepticum*. *Avian Dis.* 29: 832-837.
- BRANTON S.L., LOTT B.D., DEATON J.W., HAARDIN J.M. y MASLON W.R. (1988). F strain *Mycoplasma gallisepticum* vaccination of post-production-peak commercial Leghorns and its effect on egg and eggshell quality. *Avian Dis.* 32: 304-307.
- BRANTON S.L., LOTT B.D., MAY J.D., MASLIN W.R., BOYLE C.R. y PHARR G.T. (1997). The effects of F strain *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma synoviae*, and the dual infection in commercial layer hens over a 44-week laying cycle when challenged before beginning of lay. I. Egg production and selected egg quality parameters. *Avian Dis.* 41: 832-837.
- BRANTON S.L., LOTT B.D., MASLIN W.R. y DAY E.J. (1995). Fatty liver-hemorrhagic syndrome observed in commercial layers fed diets containing chelated minerals. *Avian Dis.* 39: 631-635.
- BRYAN T.E., GILDERSLEEVE R.P. y WIARD R.P. (1989). Exposure of Japanese quail embryos to o,p'-DDT has long-term effects on reproductive behaviors, hematology, and feather morphology. *Teratology*. 39: 525-535.
- BUNCK C.M. SPANN J.W., PATTEE O.H. y FLEMING W.J. (1985). Changes in eggshell thickness during incubation: implications for evaluating the impact of

- organochlorine contaminants on productivity. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 35: 173-182.
- BURGER J., VISCIDO K. y GOCHFELD M. (1995). Eggshell thickness in marine birds in the New York Bight—1970s to 1990s. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 29: 187-191.
- BURTON F.G., MARQUISS M. y TULLETT S.G. (1986). A note on eggshell porosity, nest humidity and the effects of DDE in the grey heron (*Ardea cinerea*). *Comp. Biochem. Physiol. C.* 85: 25-31.
- BUSS E.G. y GUYER R.B. (1984). Bone parameters of thick and thin eggshell lines of chickens. *Comp. Biochem. Physiol. A.* 78: 449-452.
- CABRERA-SAADOUN M.C. y SAUVEUR B. (1986). Histamine-induced hyperphosphatemia and hypocalcemia in the laying hen. *Comp. Biochem. Physiol. C.* 85: 391-395.
- CAREY C., LEON-VELARDE F., CASTRO G. y MONGE C. (1987). Shell conductance daily water loss and water content of andean gull and puna ibis eggs. *J. Exp. Zool. Suppl.* 1: 247-252.
- CARNARIUS K.M., CONRAD K.M., MAST M.G. y MACNEIL J.H. (1996). Relationship of eggshell ultrastructure and shell strength to the soundness of shell eggs. *Poult Sci.* 75: 656-663.
- CARRINO D.A., DENNIS J.E., WU T.M., ARIAS J.L., FERNANDEZ M.S., RODRIGUEZ J.P., FINK D.J., HEUER A.H. y CAPLAN A.I. (1996). The avian eggshell extracellular matrix as a model for biomineralization. *Connect Tissue Res.* 35: 325-329.
- CARRINO D.A., RODRIGUEZ J.P. y CAPLAN A.I. (1997). Dermatan sulfate proteoglycans from the mineralized matrix of the avian eggshell. *Connect Tissue Res.* 36: 175-193.
- CHAKRAVARTY S. y LAHIRI P. (1986). Effect of lindane on eggshell characteristics and calcium level in the domestic duck. *Toxicology.* 42: 245-258.
- CHAMBERS P.L., TWOMEY K.P. y CHAMBERS C.M. (1989). A preliminary study of the translocation of aldicarb across the duck eggshell. *Ecotoxicol Environ Saf.* 18: 296-304.

- CHEN S.-W., MAGNUS FRANCIS B. y DZIUK P.J. (1993). Effect of concentration of mixed-function oxidase on concentration of estrogen, rate of egg lay, eggshell thickness, and plasma calcium in laying hens. *J Anim Sci.* 71: 2700-2707.
- CHOWDHURY S.D. y DAVIS R.H. (1995). Influence of dietary osteolathyrogens on the ultrastructure of shell and membranes of eggs from laying hens. *Br Poult Sci.* 36: 575-583.
- CHOWDHURY S.D. y DAVIS R.H. (1998). Influence of dietary osteolathyrogens on the eggshell quality of laying hens. *Br Poult Sci.* 39: 497-499.
- CHRISTENSEN V.L., DAVIS G.S. y LUCÔRE L.A. (1996). Eggshell conductance and other functional qualities of ostrich eggs. *Poult Sci.* 75: 1404-1410.
- CHRISTENSEN V.L. y BAGLEY R.A. (1984). Vital gas exchange and hatchability of turkey eggs at high altitude. *Poult Sci.* 63: 1350-1356.
- CHRISTENSEN V.L. y BAGLEY L.G. (1987). Water balance in incubating turkey eggs. *Poult Sci.* 66: 1835-1840.
- CHRISTENSEN V.L. y DONALDSON W.E. (1992). Effect of oxygen and maternal dietary iodine on embryonic carbohydrate metabolism and hatchability of turkey eggs. *Poult Sci.* 71: 747-753.
- CHRISTENSEN V.L., HAVENSTEIN G.B. y DAVIS G.S. (1995). Egg characteristics, carbohydrate metabolism, and thyroid hormones in late chick embryos from different genetic lines. *Poult Sci.* 74: 551-562.
- CHRISTENSEN V.L., DONALDSON W.E. y MCMURTRY J.P. (1996). Physiological differences in late embryos from turkey breeders at different ages. *Poult Sci.* 75: 172-178.
- CHRISTENSEN V.L., DONALDSON W.E. y NESTOR K.E. (1997). Effects of an oxygen-enriched environment on the survival of turkey embryos between twenty-five and twenty-eight days of age. *Poult Sci.* 76: 1556-1562.
- CHRISTENSEN V.L. y ORT J.F. (1990). Influence of diet-mediated maternal thyroid alterations on functional properties of turkey eggs. *Poult Sci.* 69:1576-1581.
- CHRISTENSEN V.L. y ORT J.F. (1991). Iodine toxicity in large white turkey breeder hens. *Poult Sci.* 70: 2402-2410.

- CIPERA J.D. (1980). Source of carbon for the biosynthesis of eggshell carbonate in the hen. Comparison of six ^{14}C labeled compounds as sources of carbon in eggshells, albumen, and yolk. *Poult Sci.* 59: 1529-1537.
- CLUNIES M., PARKS D. y LEESON S. (1992). Calcium and phosphorus metabolism and eggshell formation of hens fed different amounts of calcium. *Poult Sci.* 71: 482-489.
- CLUNIES M., PARKS D. y LEESON S. (1992). Calcium and phosphorus metabolism and eggshell thickness in laying hens producing thick or thin shells. *Poult Sci.* 71: 490-498.
- COENEN T., BOUWER A., ENNINGA I. y KOEMAN J. (1992). Subchronic toxicity and reproduction effects of Tri-*n*-butyltin Oxide in Japanese Quail. *Arch Environ Contam Toxicol.* 23: 457-463.
- COETZEE C.B., CASEY N.H. y MEYER J.A. (1997). Fluoride tolerance of laying hens. *Br Poult Sci.* 38: 597-602.
- COOKE A.S. (1975). Pesticides and eggshell formation. *Symp Zool Soc Lond.* 35: 339-361.
- CURL J.S., THAYER R., WETTEMANN R.P. y MORRISON R. (1985). Preovulatory concentrations of progesterone and estradiol in plasma and their relationships with eggshell quality in the laying hen. *Poult Sci.* 64: 2383-2387.
- DAMRON B.L. (1998). Sodium chloride concentration in drinking water and eggshell quality. *Poult Sci.* 77: 1488-1491.
- DAMRON B.L. y FLUNKER L.K. (1995). Calcium supplementation of hen drinking water. *Poult Sci.* 74: 784-787.
- ELAROUSSI M.A., FORTE L.R., BIELLIER H.V., EBER S.L. POELLING R.E. y KRAUSE W.J. (1988). Indexes of vitamin D deficiency in Japanese quail embryos. *Am J Physiol.* 254: E 639-651.
- ELAROUSSI M.A., UHLAND-SMITH A., HELLWIG W. y DELUCA H.F. (1994). The role of vitamin D in chorioallantoic membrane calcium transport. *Biochim Biophys Acta.* 1192: 1-6.
- ELAROUSSI M.A. y DELUCA H.F. (1994). Calcium uptake by chorioallantoic membrane: effects of vitamins D and K. *Am J Physiol.* 267: E837-841.

ELAROUSSI M.A., FORTE L.R., EBER S.L. y BIELLIER H.V. Adaptation of the kidney during reproduction: role of estrogen in the regulation of responsiveness to parathyroid hormone. *Poult Sci.* 72: 1548-1556.

ELLIOTT J.E., NORSTROM R.J. y SMITH G.E. (1996). Patterns, trends, and toxicological significance of chlorinated hydrocarbon and mercury contaminants in bald eagle eggs from the Pacific coast of Canada, 1990-1994. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 31: 354-367.

ENTWISTLE K.M., SILYN-ROBERTS H. y OCHIENG ABUODHA S. (1995). The relative fracture strengths of the inner and outer surfaces of the eggshell of the domestic fowl. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* 262: 169-174.

FARMER M., ROLAND SR. D.A., y ECKMAN M.K. (1983). Calcium metabolism in broiler breeder hens. 2. The influence of the time of feeding on calcium status of the digestive system and eggshell quality in broiler breeders. *Poult Sci.* 62: 465-471.

FERNANDEZ M.S., ARAYA M. y ARIAS J.L. (1997). Eggshells are shaped by a precise spatio-temporal arrangement of sequentially deposited macromolecules. *Matrix Biol.* 16: 13-20.

FRASER A.C., BAIN M.M. y SOLOMON S.E. (1998). Organic matrix morphology and distribution in the palisade layer of eggshells sampled at selected periods during lay. *Br Poult Sci.* 39: 225-228.

FROST T.J., ROLAND SR. D.A. y UNTAWALE G.G. (1990). Influence of vitamin D3, 1 alpha-hydroxyvitamin D3, and 1,25-dihydroxyvitamin D3 on eggshell quality, tibia strength, and various production parameters in commercial laying hens. *Poult Sci.* 69: 2008-2016.

FRY D.M. (1995). Reproductive effects in birds exposed to pesticides and industrial chemicals. *Environ Health Perspect.* 103 Suppl 7: 165-171.

GAUTRON J., BAIN M., SOLOMON S. y NYS Y. (1996). Soluble matrix of hen's eggshell extracts changes in vitro the rate of calcium carbonate precipitation and crystal morphology. *Br Poult Sci.* 37: 853-866.

GAUTRON J., HINCKE M.T. y NYS Y. (1997). Precursor matrix proteins in the uterine fluid change with stages of eggshell formation in hens. *Connect Tissue Res.* 36: 195-210.

- GIAMBRONE J.J., HATHCOCK T.L. y LOCKABY S.B. (1991). Effect of a live reovirus vaccine on reproductive performance of broiler breeder hens and development of viral tenosynovitis in progeny. *Avian Dis.* 35: 380-383.
- GILBERSON M., KUBIAK T., LUDWIG J. y FOX G. (1991). Great Lakes embryo mortality, edema, and deformities syndrome (GLEMEDS) in colonial fish-eating birds: similarity to chick-edema disease. *J Toxicol Environ Health.* 33: 455-520.
- GORDON R.W. y ROLAND SR. D.A. (1998). Influence of supplemental phytase on calcium and phosphorus utilization in laying hens. *Poult Sci.* 77: 290-294.
- GRAVELAND J. y BERENDS A.E. (1997). Timing of the calcium intake and effect of calcium deficiency on behavior and egg laying in captive great tits, *Parus major*. *Physiol Zool.* 70: 74-84.
- GRIER J.W. (1982). Ban of DDT and subsequent recovery of reproduction in bald eagles. *Science.* 218: 1232-1234.
- GRUHN K. y ZANDER R. (1985). [Utilization of 15 N marked urea by the laying hen. 2. Incorporation and metabolism of 15N for the synthesis of egg protein]. *Arch Tierernahr.* 35: 791-798.
- GUINOTTE F., GAUTRON J., NYS Y. y SOUMARMON A. (1995). Calcium solubilization and retention in the gastrointestinal tract in chicks (*Gallus domesticus*) as a function of gastric acid secretion inhibition and of calcium carbonate particle size. *Br J Nutr.* 73: 425-439.
- HARMS R.H. (1991). Specific gravity of eggs and eggshell weight from commercial layers and broiler breeders in relation to time of oviposition. *Poult Sci.* 70: 1099-1104.
- HARMS R.H., BOOTWALLA S.M., WOODWARD S.A., WILSON H.R. y UNTAWALE G.A. (1990). Some observations on the influence of vitamin D metabolites when added to the diet of commercial laying hens. *Poult Sci.* 69: 426-432.
- HEMPLEMAN S.C., ADAMSON T.P., y BEBOUT D.E. (1993). Oxygen and avian eggshell formation at high altitude. *Respir Physiol.* 92: 1-12.
- HESS J.B. y BRITTON W.M. (1997). Effects of dietary magnesium excess in White Leghorn hens. *Poult Sci.* 76: 703-710.
- HILL E.F. y SHAFFNER C.S. (1976). Sexual maturation and productivity of Japanese Quail fed graded concentrations of mercuric chloride. *Poult. Sci.* 55: 1449-1459.

- HINCKE M.T., BERNARD A.-M., LEE E.R., TSANG C.P.W. y NARBAITZ R. (1992). Soluble protein constituents of the domestic fowl's eggshell. *Br Poult Sci.* 33: 505-516.
- HINCKE M.T., TSANG C.P., COURTNEY M., HILL V. y NARBAITZ R. (1995). Purification and immunochemistry of a soluble matrix protein of the chicken eggshell (ovocleidin 17). *Calcif Tissue Int.* 56: 578-583.
- HUGHES, B.O., GILBERT A.B. y BROWN M.F. (1986). Categorization and causes of abnormal egg shells: relationship with stress. *Br Poult Sci.* 27: 325-337.
- HUTCHISON M.J., LIRETTE A., ETCHES R.J., TOWNER R.A. y JANZEN E.G. (1992). Research note: an assessment of egg yolk structure using magnetic resonance imaging. *Poult Sci.* 71: 2117-2121.
- JARMAN W.M., BURNS S.A., BACON C.E., RECHTIN J., DeBENEDETTI S., LINTHICUM J.L. y WALTON B.J. (1996). High levels of HCB and DDE associated with reproductive failure in prairie falcons (*Falco mexicanus*) from California. *Bull Environ Contam Toxicol.* 57: 8-15.
- JENG S.L., LEE S.J., LIU Y.F., YANG S.C. y LIOU P.P. (1997). Effect of lead ingestion on concentrations of lead in tissues and eggs of laying Tsaiya ducks in Taiwan. *Poult. Sci.* 76: 13-16.
- JONES F.T., RIVES D.V. y CAREY J.B. (1995). Salmonella contamination in commercial eggs and an egg production facility. *Poult Sci.* 74: 753-757.
- KAMIHIRA M., OGUCHI S., TACHIBANA A., KITIGAWA Y. y IIJIMA S. (1998). Improved hatching for in vitro quail embryo culture using surrogate eggshell and artificial vessel. *Dev Growth Differ.* 40:449-455.
- KERR J.M., RICHARDS M.P. y SOARES JR. J.H. (1994). Calcium homeostasis in in ovo and ex ovo turkey embryos. *Growth Dev Aging.* 58: 149-155.
- KESHAVARZ K. y McCORMICK C.C. (1991). Effect of sodium aluminosilicate, oyster shell, and their combinations on acid-base balance and eggshell quality. *Poult Sci.* 70: 313-325.
- KESHAVARZ K. y AUSTIC R.E. (1990). Effects of dietary minerals on acid-base balance and eggshell quality in chickens. *J Nutr.* 120: 1360-1369.
- KESHAVARZ K. (1996). The effect of different levels of vitamin C and cholecalciferol with adequate or marginal levels of dietary calcium on performance and eggshell quality of laying hens. *Poult Sci.* 75: 1227-1235.

- KING K.A., CUSTER T.W. y QUINN J.S. (1991). Effects of mercury, selenium, and organochlorine contaminants on reproduction of Forster's terns and black skimmers nesting in a contaminated Texas Bay. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 20: 32-40.
- KLOS H.G., LANGNER H.J., BOEGNIGK G., WANDELBURG K., POHL H., GRUND S., EICHBERG J. y STEGLICH W. (1976). Chemical and physical studies on the eggshell of 4 species of running birds. *Zentralbl Veterinarmed.* 23: 413-428.
- KOELKEBECK K.W., PARSONS C.M., LEEPER R.W. y MOSHTAGHIAN J. (1992). Effect of duration of fasting on postmolt laying hen performance. *Poult Sci.* 71: 434-439.
- KOLAJA G.J. y HINTON D.E. (1977). Effects of DDT on eggshell quality and calcium adenosine triphosphatase. *J Toxicol Environ Health.* 3: 699-704.
- KOVATSI A., KOTSAKI-KOVATSI V.P., NIKOLAIDIS E., FLASKOS J., TZIKA S. y TZOTZAS G. (1994). The influence of *Datura ferox* alkaloids on egg-laying hens. *Vet Hum Toxicol.* 36: 89-92.
- KUBENA L.F. (1982). The influence of diflubenzuron on several reproductive characteristics in male and female layer-breed chickens. *Poult Sci.* 61: 268-271.
- LAVELIN I., YARDEN N., BEN-BASSAT S., BAR A. y PINES M. (1998). Regulation of osteopontin gene expression during egg shell formation in the laying hen by mechanical strain. *Matrix Biol.* 17: 615-23.
- LAVELLE P.A., LLOYD Q.P., GAY C.V. y LEACH JR. R.M. (1994). Vitamin K deficiency does not functionally impair skeletal metabolism of laying hens and their progeny. *J Nutr.* 124: 371-377.
- LEACH JR. R.M. y GROSS J.R. (1983). The effect of manganese deficiency upon the ultrastructure of the eggshell. *Poult Sci.* 62: 499-504.
- LEESON S., CASTON L.J. y SUMMERS J.D. (1991). Response of laying hens to supplemental niacin. *Poult Sci.* 70: 1231-1235.
- LENNARDS R., ROLAND SR. D.A. y MCGUIRE J.A. (1981). The relationship of serum calcium to chell weight and other criteria in hens laying a low or high incidence of shell-less eggs. *Poult Sci.* 60: 2501-2505.

- LEON-VELARDE F., MEJIA O., PALACIOS J.A. y MONGE C. (1997). Changes in whole blood oxygen affinity and eggshell permeability in high altitude chickens translocated to sea level. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 118: 53-57.
- LI S., AGGREY S.E., ZADWORNÝ D., FAIRFULL W. y KUHNLEIN U. (1998). Evidence for a genetic variation in the mitochondrial genome affecting traits in White Leghorn chickens. *J Hered.* 89: 222-226.
- LIU S.K., DOLENSEK E.P. y TAPPE J.P. (1985). Cardiomyopathy and vitamin E deficiency in zoo animals and birds. *Heart Vessels Suppl.* 1: 288-293.
- LOCKE L.N., BAGLEY G.E. y IRBY H.D. (1966). Acid-fast intranuclear inclusion bodies in the kidneys of mallards fed lead shot. *Bull. Wildlife Dis. Assoc.* 2: 127-131.
- LONGZARICH D.G., HARVEY T.E. y TAKEKAWA J.E. (1992). Trace element and organochlorine concentration in California Clapper Rail (*Rallus longirostris obsoletus*) eggs. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 23: 147-153.
- LOWE T.P. y STENDELL R.C. (1991). Eggshell modifications in captive American Kestrels resulting from Aroclor 1248 in the diet. *Arch Chem Contam Toxicol.* 20: 519-522.
- LUNDHOLM C.E. (1990). Increased eggshell thickness in domestic fowls after administration of the antiprogesterone RU 38486 (Mifepristone). *Pharmacol Toxicol.* 67:185-187.
- LUNDHOLM C.E. (1992). Progesterone stimulates prostaglandin synthesis in eggshell gland mucosa of estrogen-primed chickens. *Comp Biochem Physiol.* 103:217-220.
- LUNDHOLM C.E. (1985). Relation between Ca^{2+} uptake and ATPase activity in the particulate fractions of the eggshell gland mucosa of the domestic fowl and duck. *Comp Biochem Physiol.* 81: 787-799.
- LUNDHOLM C.E. y BARTONEK M. (1992). Inhibition of eggshell formation in domestic fowl by indomethacin: relation to calcium and prostaglandin metabolism in the eggshell gland mucosa. *Comp Biochem Physiol C.* 102: 379-383.
- LUNDHOLM C.E. (1991). Relationship between thinning of eggshells and reduction in number of eggs produced after administration of some saluretic drugs in domestic fowls. *Comp Biochem Physiol.* 100C: 519-523.

- LUNDHOLM C.E. y BARTONEK M. (1992). Furosemide decreases eggshell thickness and inhibits 45Ca^{2+} uptake by a subcellular fraction of eggshell gland mucosa of the domestic fowl. *Comp Biochem Physiol.* 101: 317-320.
- LUNDHOLM C.E. (1990). The distribution of calmodulin in the mucosa of the avian oviduct and the effect of *p-p'*-DDE on some of its metabolic parameters. *Comp Biochem Physiol.* 96C: 321-326.
- LUNDHOLM C.D. (1997). DDE-induced eggshell thinning in birds: effects of *p,p'*-DDE on the calcium and prostaglandin metabolism of the eggshell gland. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol.* 118: 113-128.
- LUNDHOLM C.E. (1994). Changes in the levels of different ions in the eggshell gland lumen following *p,p'*-DDE-induced eggshell thinning in ducks. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol.* 109: 57-62.
- LUNDHOLM C.E. y BARTONEK M. (1992). Effects of *p,p'*-DDE and some other chlorinated hydrocarbons on the formation of prostaglandins by the avian eggshell gland mucosa. *Arch Toxicol.* 66: 387-391.
- LUNDHOLM C.E. (1991). Influence of chlorinated hydrocarbons, Hg^{2+} and methyl- Hg^{+} on steroid hormone receptors from eggshell gland mucosa of domestic fowls and ducks. *Arch Toxicol.* 65: 220-227.
- LUNDHOLM C.E. (1988). The effects of DDE, PCB and chlordane on the binding of progesterone to its cytoplasmic receptor in the eggshell gland mucosa of birds and the endometrium of mammalian uterus. 89: 361-368.
- LUNDHOLM C.E. (1985). Relation between Ca metabolism and ATPase activities in the subcellular fractions from duck eggshell gland mucosa after DDE administration during different stages of eggshell formation. *Comp Biochem Physiol C.* 82: 1-16.
- LUNDHOLM C.E. (1984). Comparison of the effect of DDE on the Ca metabolism of the eggshell gland and its subcellular fractions of the duck and the domestic fowl. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh).* 54: 400-407.
- LUNDHOLM C.E. (1984). Effect of DDE on the Ca metabolism of the duck eggshell gland and its subcellular fractions; relation to the functional stage. *Comp Biochem Physiol C.* 78: 5-12.
- LUNDHOLM C.E. y MATHSON K. (1983). The inhibitory effect of some chlorinated hydrocarbon pesticides on the ATP-dependent Ca^{2+} binding of the particulate fraction of the eggshell gland mucosa cells. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh).* 52: 390-394.

LUNDHOLM C.E. (1995). Effects of methyl mercury at different dose regimes on eggshell formation and some biochemical characteristics of the eggshell gland mucosa of the domestic fowl. *Comp. Biochem. Physiol. C Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* 110: 23-28.

LUNDHOLM C.E. (1987). Methyl mercury decreases the eggshell thickness and inhibits the Ca^{2+} uptake in a homogenate of the eggshell gland mucosa and its subcellular fractions from the domestic fowl. *Pharmacol. Toxicol.* 60: 385-388.

LUNDHOLM C.E. y MATHSON K. (1986). Effect of some metal compounds on the Ca^{2+} binding and Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATPase activity of eggshell gland mucosa homogenate from the domestic fowl. *Acta. Pharmacol. Toxicol. (Copenh).* 59: 410-415.

MAHMOUD K.Z., BECK M.M., SCHEIDELER S.E., FORMAN M.F., ANDERSON K.P. y KACHMAN S.D. (1996). Acute high environmental temperature and calcium-estrogen relationships in the hen. *Poult Sci.* 75: 1555-1562.

MEIR M. y AR A. (1987). Improving turkey poult quality by correcting incubator humidity to match eggshell conductance. *Br Poult Sci.* 28: 337-342.

MEIR M. y AR A. (1996). Artificial increase of eggshell conductance improves hatchability of early laid goose eggs. *Br Poult Sci.* 37: 937-951.

MINEAU P., BOERSMA D.C. y COLLINS B. (1994). An analysis of avian reproduction studies submitted for pesticide registration. *Ecotoxicol Environ Saf.* 29: 304-329.

MIYAMOTO T., HORIE T., BABA E., SASAI K., FUKATA T. y ARAKAWA A. (1998). Salmonella penetration through eggshell associated with freshness of laid eggs and refrigeration. *J Food Prot.* 61: 350-353.

MORENG R.E., BALNAVE D. y ZHANG D. (1992). Dietary zinc methionine effect on eggshell quality of hens drinking saline water. *Poult Sci.* 71: 1163-1167.

NASCIMENTO V.P., CRANSTOUN S. y SOLOMON S.E. (1992). Relationship between shell structure and movement of Salmonella enteritidis across the eggshell wall. *Br Poult Sci.* 33: 37-48.

NOGAREDA C., BRUFAU J., PEREZ-VENTRELL A., ANGULO E., ALMIRALI M. y ESTEVE-GARCIA E. (1990). Bioavailability of fluorine in sepiolite for laying hens. *Poult Sci.* 69: 2165-2169.

- NYS Y., PARKES C.O. y THOMASSET M. (1986). Effects of suppression and resumption of shell formation and parathyroid hormone on uterine calcium-binding protein, carbonic anhydrase activity, and intestinal calcium absorption in hens. *Gen Comp Endocrinol.* 64: 293-299.
- ODOM T.W., ROSENBAUM L.M. y JEFFREY J.S. (1995). Experimental reduction of eggshell conductance during incubation. I. effect on the susceptibility to ascites syndrome. *Avian Dis.* 39: 821-829.
- ORBAN J.I., ROLAND SR. D.A., CUMMINS K. y LOVELL R.T. (1993). Influence of large doses of ascorbic acid on performance, plasma calcium, bone characteristics, and eggshell quality in broilers and leghorn hens. *Poult Sci.* 72: 691-700.
- PACKARD M.J. y PACKARD G.C. (1993). Water loss from eggs of domestic fowl and calcium status of hatchlings. *J Comp Physiol.* 163: 327-331.
- PADRON M. (1990). Salmonella typhimurium penetration through the eggshell of hatching eggs. *Avian Dis.* 34: 463-465.
- PASS D.A., LITTLE P.B. y KARSTAD L.H. (1975). The pathology of subacute and chronic methyl mercury poisoning of the Mallard Duck (*Anas platyrhynchos*). *J. Comp. Path.* 85: 7-21.
- PATTEE O.H., WIEMEYER S.N. y SWINEFORD D.M. (1988). Effects of dietary fluoride on reproduction in eastern screech-owls. *Arch Environ Contam Toxicol.* 17: 213-218.
- PATTEE O.H. (1984). Eggshell thickness and reproduction in American Kestrels exposed to chronic dietary lead. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 13: 29-34.
- PEAKALL D.B., LEW T.S., SPRINGER A.M., WALKER II W., RISEBROUGH R.W., MONK J.G., JARMAN W.M., WALTON B.J., REYNOLDS L.M., FYFE R.W. y KIFF L.F. (1983). Determination of the DDE and PCB contents of peregrine falcon eggs: a comparison of whole egg measurements and estimates derived from eggshell membranes. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 12: 523-528.
- PEEBLES E.D. y MARKS H.L. (1991). Effects of selection for growth and selection diet on eggshell quality and embryonic development in Japanese quail. *Poult Sci.* 70: 1474-1480.
- PEEBLES E.D., PUGH C.R., BOYLE C.R., LATOUR M.A., PUGH N.P. y BRAKE J.D. (1993). Ultrasonography as a tool for monitoring in ovo chicken development. 2. Effects

of eggshell alteration and ultrasonography on embryonic and posthatch development. *Poult Sci.* 72: 2247-2253.

PEEBLES E.D., MILLER E.H., BOYLE C.R., BRAKE J.D. y LATOUR M.A. (1994). Effects of dietary thiouracil on thyroid activity, egg production, and eggshell quality in commercial layers. *Poult Sci.* 73: 1829-1837.

PEEBLES E.D., MILLER E.H., BOYLE C.R., BRAKE J.D., LATOUR M.A. y THAXTON J.P. (1997). Effects of consecutive thiouracil exposures in the juvenile and adult single comb White Leghorn chicken on body weight and reproductive performance. *Poult Sci.* 76: 236-243.

PEEBLES E.D., MILLER E.H., BRAKE J.D. y SCHULTZ C.D. (1992). Effects of ascorbic acid on plasma thyroxine concentrations and eggshell quality of Leghorn chickens treated with dietary thiouracil. *Poult Sci.* 71: 553-559.

PEEBLES E.D., PANSKY T., DOYLE S.M., BOYLE C.R., SMITH T.W., LATOUR M.A. y GERARD P.D. (1998). Effects of dietary fat and eggshell cuticle removal on egg water loss and embryo growth in broiler hatching eggs. *Poult Sci.* 77: 1522-1530.

PERROTT H.R., SCOTT V.D. y BOARD R.G. (1981). Crystal orientation in the shell of the domestic fowl: an electron diffraction study. *Calcif Tissue Int.* 33: 119-124.

QUINTANA C., QUETTIER A., y SANDOZ D. (1980). Localization of mineral elements in normal and strontium-intoxicated quail eggshell by secondary ion mass spectroscopy and electron probe microanalysis. *Calcif Tissue Int.* 30:151-161.

RABIE M.H. SZILAGYI M. y GIPPERT T. (1997). Effects of dietary L-carnitine on the performance and egg quality of laying hens from 65-73 weeks of age. *Br J Nutr.* 78: 615-623.

RABON JR. H.W., ROLAND SR. D.A., BRYANT M.M., SMITH R.C., BARNES D.G. y LAURENT S.M. (1995). Absorption of silicon and aluminum by hens fed sodium zeolite A with various levels of dietary cholecalciferol. *Poult Sci.* 74: 352-359.

RAHN H., PAGANELLI C.V. y AR A. (1987). Pores and gas exchange of avian eggs: a review. *J Exp Zool Suppl.* 1: 165-172.

RAMBECK W.A. y ZUCKER H. (1985). Synergistic effects of 1,25(OH)₂D₃ and 24,25(OH)₂D₃ on duodenal CaBP in rachitic chicks and on eggshell weight in Japanese quails. *Biochem Biophys Res Commun.* 126: 799-804.

- RAO S.K., ROLAND, SR. D.A. y HOERR F.J. (1992). Response of early- and late-maturing commercial Leghorn pullets to low levels of dietary phosphorus. *Poult Sci.* 71: 691-699.
- RATTNER B.A., EROSCHENKO V.P., FOX G.A., FRY D.M. y GORSLINE J. (1984). Avian endocrine responses to environmental pollutants. *J Exp Zool.* 232: 683-689.
- RICHARDS M.P. (1982). Long-term shell-less culture of turkey embryos. *Poult Sci.* 61: 2089-2096.
- ROLAND SR. D.A., BRYANT M.M., RABON H.W. y SELF J. (1996). Influence of calcium and environmental temperature on performance of first-cycle (phase 1) commercial leghorns. *Poult Sci.* 75: 62-68.
- ROQUE L. y SOARES M.C. (1994). Effects of Eggshell quality and broiler breeder age on hatchability. *Poult Sci.* 73: 1838-45.
- RAO S.K. y ROLAND SR. D.A. (1992). Response of early- late- maturing commercial Leghorn pullets to Low levels of dietary phosphorus. *Poult Sci.* 71: 691-699.
- SCHWARZBACH S.E. (1991). The role of dicofol metabolites in the eggshell thinning response of ring neck doves. *Arch Environ Contam Toxicol.* 20: 200-205.
- SWARZBACH S.E., FRY D.M., ROSSON B.E. y BIRD D.M. (1991). Metabolism and storage of *p,p'* Dificol in American Kestrels (*Falco sparverius*) with comparisons to ring neck doves (*Streptopelia risoria*). *Arch Environ Contam Toxicol.* 20: 206-210.
- SIBLY R.M. y SIMKISS K. (1987). Gas diffusion through non-tubular pores. *J Exp Zool Suppl.* 1: 187-191.
- SIMKISS K. (1986). Eggshell conductance, Fick's or Stefan's Law? *Respir Physiol.* 65: 213-222.
- SIOPEs T.D. (1987). Pineal gland and ocular influences on turkey breeder hens. Body weight, feed intake, and egg characteristics. *Poult Sci.* 66: 528-534.
- SOARES JR. J.H., KAETZEL D.M., ALLEN J.T. y SWERDEL M.R. (1982). Toxicity of a vitamin D steroid to laying hens. *Poult Sci.* 62: 24-29.
- SOH T. y KOGA O. (1994). The effects of sex steroid hormones on the pigment accumulation in the shell gland of japanese quail. *Poult Sci.* 73: 179-185.

- SOLOMON S.E. (1999). Gordon Memorial Lecture. An egg ist ein ei, es un huevo, est un oeuf. *Br Poult Sci.* 40: 5-11.
- SUZUKI J., NISHIZAWA T., INAGAWA H., OKUTOMI T., MORIKAWA A., SOMA G. y MISUNO D. (1992). Homeostasis as regulated by activated macrophage. IX. Enhancement effect of LPSw (a lipopolysaccharide from wheat flour) on hen egg-laying and breaking strength of eggshell. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 40: 1274-1276.
- TAZAWA H., HASHIMOTO Y. NAKZAWA S. y WHITTOW G.C. (1992). Metabolic responses of chicken embryos and hatchlings to altered O₂ environments. *Respir Physiol.* 88: 37-50.
- TOIEN O., PAGANELLI C.V., RAHN H. y JOHNSON R.R. (1988). Diffusive resistance of avian eggshell pores. *Respir Physiol.* 74: 345-354.
- TSANG C.P. y GRUNDER A.A. (1993). Effect of dietary contents of cholecalciferol, 1 alpha, 25-dihydroxycholecalciferol and 24, 25-dihydroxycholecalciferol on blood concentrations of 25-hydroxycholecalciferol, 1 alpha, 25-dihydroxycholecalciferol, total calcium and eggshell quality. *Br Poult Sci.* 34: 1021-1027.
- TSUDZUKI M. (1995). New findings in the stumpy-limb mutation of Japanese quail. *J Hered.* 86: 66-68.
- UM J.S. y PAIK I.K. (1999). Effects of microbial phytase supplementation on egg production, eggshell quality, and mineral retention of laying hens fed different levels of phosphorus. *Poult Sci.* 78: 75-79.
- VAN DE VELDE J.P., LOVERIDGE N. y VERMEIDEN J.P. (1984). Parathyroid hormone responses to calcium stress during eggshell calcification. *Endocrinology.* 115: 1901-1904.
- VAN DE VELDE J.P., VERMEIDEN J.P. y BLOOT A.M. (1985). Medullary bone matrix formation, mineralization, and remodeling related to the daily egg-laying cycle of Japanese quail: a histological and radiological study. *Bone.* 6: 321-327.
- VAN TOLEDO B. y COMBS JR. G.F. (1984). Fluorosis in the laying hen. *Poult Sci.* 63: 1543-1552.
- VIKEREN T. y STUVE G. (1996). Fluoride exposure and selected characteristics of eggs and bones of the herring gull (*Larus argentatus*) and the common coll (*Larus canus*). *J Wildlife Dis.* 32: 190-198.

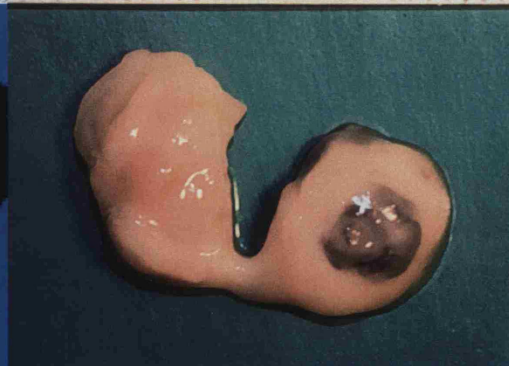
- VILCHEZ C., TOUCHBURN S.P., CHAVEZ E.R. y LAGUE P.C. (1992). Research note: eggshell quality in Japanese quail fed different fatty acids. *Poult Sci.* 71: 1568-1571.
- VISSCHEDIJK A.H. (1991). Gordon memorial lecture. Physics and physiology of incubation. *Br Poult Sci.* 1: 3-20.
- WADDELL A.L., BOARD R.G., SCOTT V.D. y TULLETT S.G. (1991). Role of magnesium in egg shell formation in the domestic hen. *Br Poult Sci.* 32: 853-864.
- WANG H. y SLAVIK M.F. (1998). Bacterial penetration into eggs washed with various chemicals and stored at different temperatures and times. *J Food Prot.* 61: 276-279.
- WATANABE E., KOBAYASHI S., TERASHIMA Y y ITOH H. (1987). Adenosine triphosphatase in the uterus and duodenum of chicken hens during eggshell formation. *Poult Sci.* 68: 564-568.
- WESELOH D.V., MINEAU P. y STRUGER J. (1990). Geographical distribution of contaminants and productivity measures of herring gulls in the Great Lakes: Lake Erie and connecting channels 1978/79. *Sci Total Environ.* 91: 141-159.
- WHISTLER P.E. y SHELDON B.W. (1989). Bactericidal activity eggshell conductance and hatchability effects of ozone versus formaldehyde disinfection. *Poult Sci.* 68: 1074-1077.
- WIDEMAN JR. R. y BUSS E. (1985). Arterial blood gas, pH, and bicarbonate values in laying hens selected for thick or thin eggshell production. *Poult Sci.* 64: 1015-1019.
- WIDEMAN JR. R.F. (1987). Renal regulation of avian calcium and phosphorus metabolism. *J Nutr.* 117: 808-815.
- WIDEMAN R.F., FORD B.C., DIBNER J.J. ROBEY W.W. y YERSIN A.G. (1994). Responses of laying hens to diets containing up to 2% DL-methionine or equimolar (2.25%) 2-hydroxy-4-(methylthio) butanoic acid. *Poult Sci.* 73: 259-267.
- WIKTELIUS S. Y EDWARDS C.A. (1997). Organochlorine insecticide residues in African Fauna: 1971-1995. *Rev Environ Contam Toxicol.* 151: 1-37.
- WYATT C.L., JENSEN S. y ROWLAND III G.N. (1990). Effect of cimetidine on eggshell quality and plasma 25-hydroxycholecalciferol in laying hens. *Poult Sci.* 69:1892-1899.

YAMAMOTO T., OZAWA H. y NAGAI H. (1985). Histochemical studies of Ca-ATPase, succinate and NAD⁺-dependent isocitrate dehydrogenases in the shell gland of laying Japanese quails: with special reference to calcium-transporting cells. *Histochemistry*. 83: 221-226.

ZAPATA L.F. y GERNAT A.G. (1995). The effect of four levels of ascorbic acid and two levels of calcium on eggshell quality of forced-molted White Leghorn hens. *Poult Sci*. 74: 1049-1052.



**ULTRAESTRUCTURA, DISTRIBUCION Y
CUANTIFICACION DE CUERPOS MAMILARES Y
FIBRAS, EN RELACION CON LA VIABILIDAD
EMBRIONARIA DEL AGUILA PERDICERA
(*Hieraaetus fasciatus*)**



Juan Manuel Blanco Portillo

FIGURAS

FIGURA 1. Selección de las medidas más relevantes efectuadas sobre la sección transversal de la cáscara en el águila perdicera. Grosor mínimo de la capa de cristalización externa ($G_{\min c\text{ext}}$), grosor máximo de la capa de empalizada ($G_{\max c\text{emp}}$), grosor de la capa mamilar (G_{cmam}), área entre mamilas (A_{em}), área de la capa de cristalización externa (C_{cext}), área de la capa de empalizada (C_{empal}), área de la capa mamilar (C_{mam}), grosor máximo de la capa de cristalización externa ($G_{\max C_{\text{cext}}}$), ángulo de orientación de las columnas romboedricas (Orienta colu), grosor mínimo de la capa de empalizada ($G_{\min c\text{emp}}$). Magnificación 150 X.

FIGURA 2. Sección transversal de la cáscara del águila perdicera. Magnificación 150 X.

FIGURA 2a. Detalle de los canales con apertura en poros de superficie en un detalle de la capa de cristalización externa. Tomada de la Figura 2.

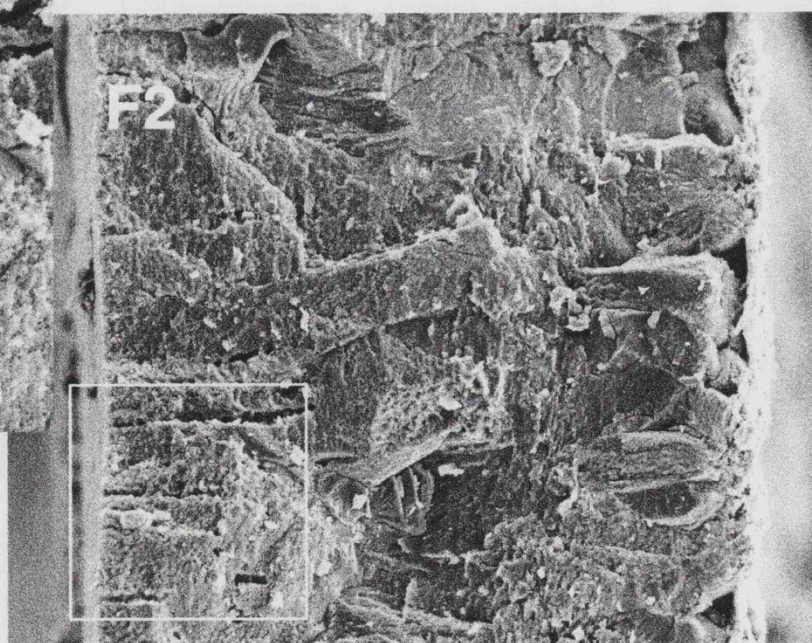
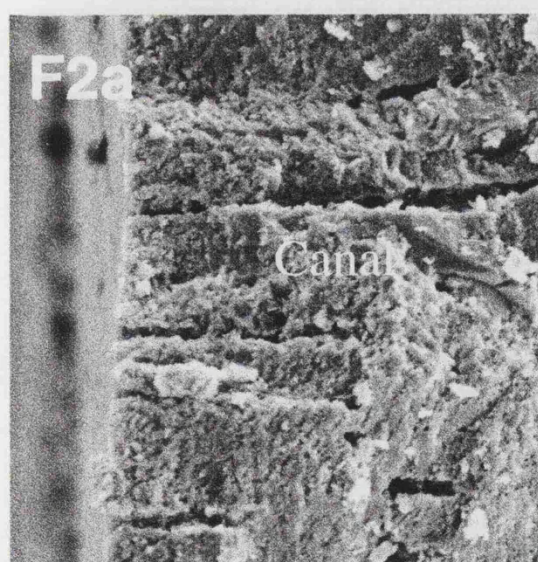
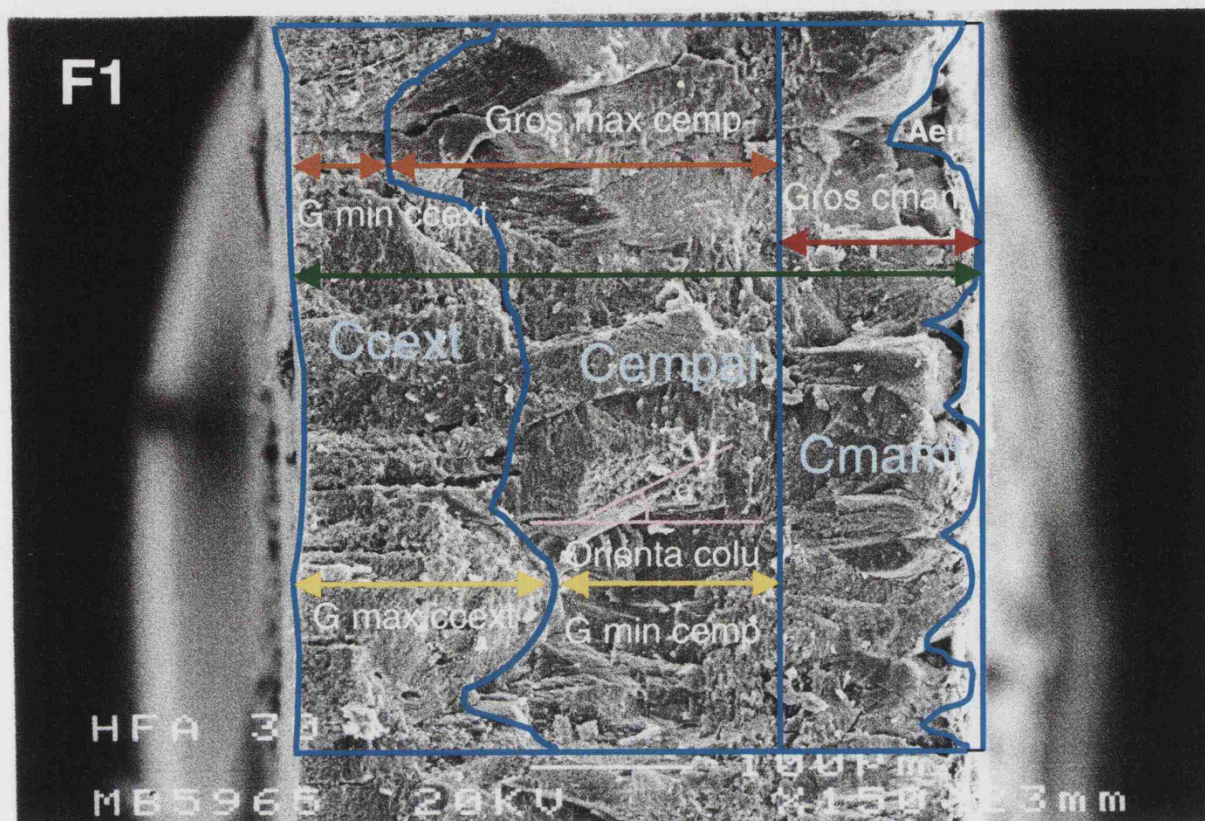


FIGURA 3. Imagen de la superficie externa de la cáscara. Área de baja densidad de poros. Magnificación 100X.

FIGURA 3a. Detalle a mayores aumentos de la tomada de la Figura 3.

FIGURA 3b. Aspecto de la superficie externa de la cáscara. Tomada de la Figura 3.

FIGURA 4. Microfotografía tomada como modelo para el cálculo de magnitudes en la superficie interna de la cáscara o base de la capa mamilar. Imagen representativa para el estudio del área delimitada entre mamilas (A intermam) y distancia entre núcleos mamilares (Dist entre Nuc). Magnificación 150 X.

FIGURA 4a. Detalle de la superficie interna de la capa mamilar mostrando detalles del cálculo del área mamilar (Am) y el área de núcleos mamilares (Núcleos). Tomada de la Figura 4

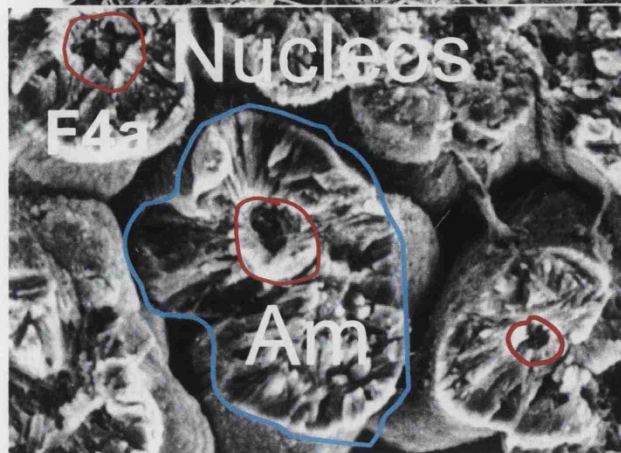
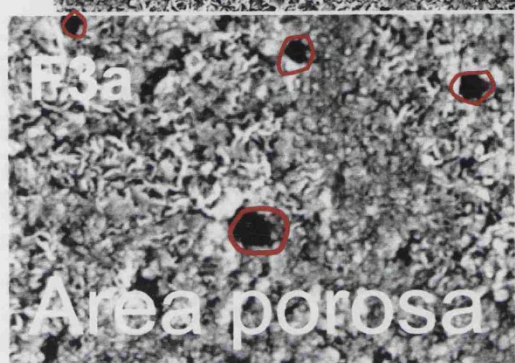
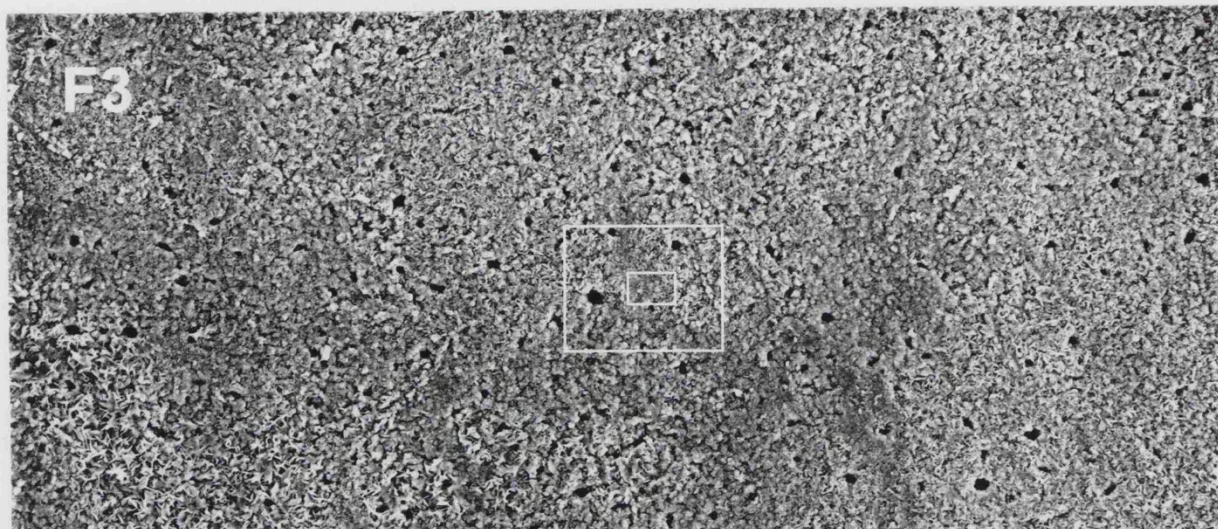


FIGURA 5. Columnas romboédricas en la capa de empalizada. Magnificación 750 X.

FIGURA 5a y 5b. Detalle de las áreas de mayor y menor número de vesículas en la capa de empalizada. Tomada de la Figura 5

FIGURA 6. Imagen tomada como modelo para las medidas realizadas en la sección transversal de las membranas testáceas externa e interna. Magnificación 500 X.

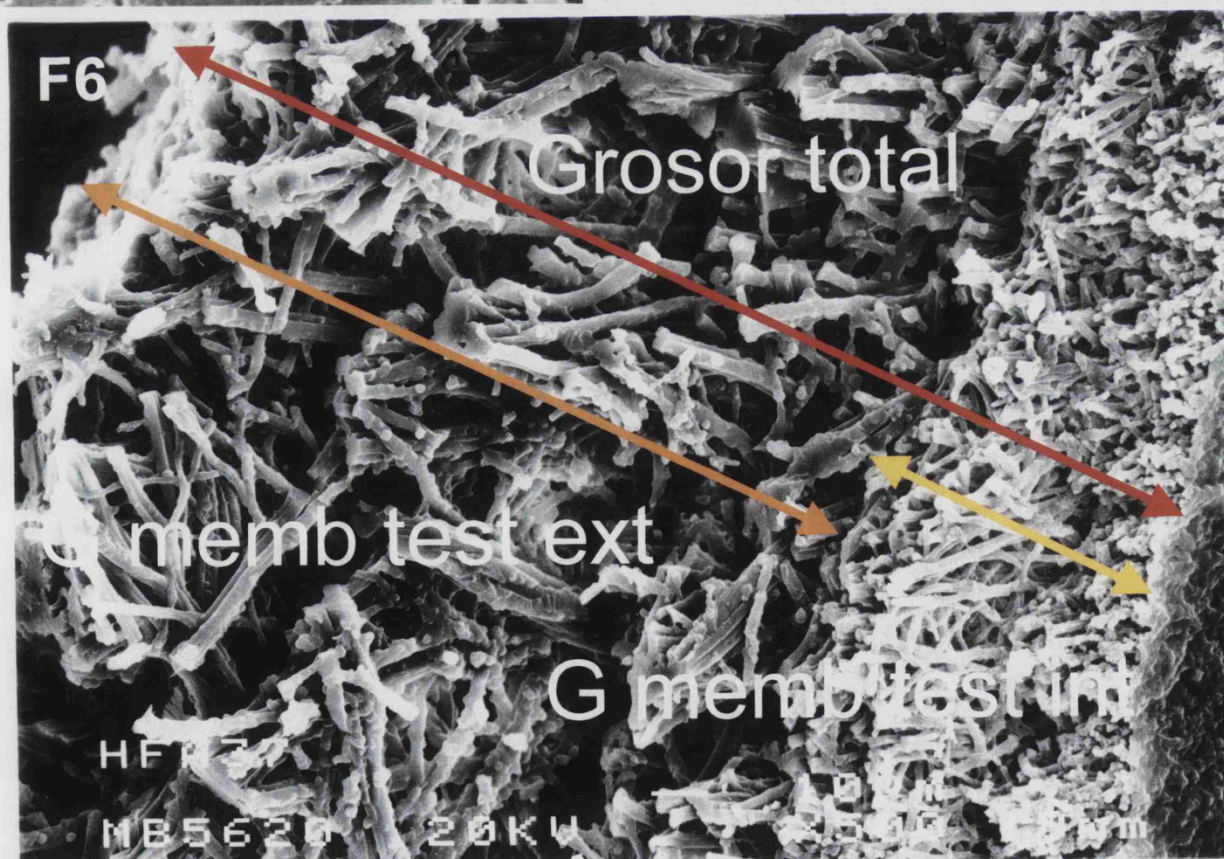
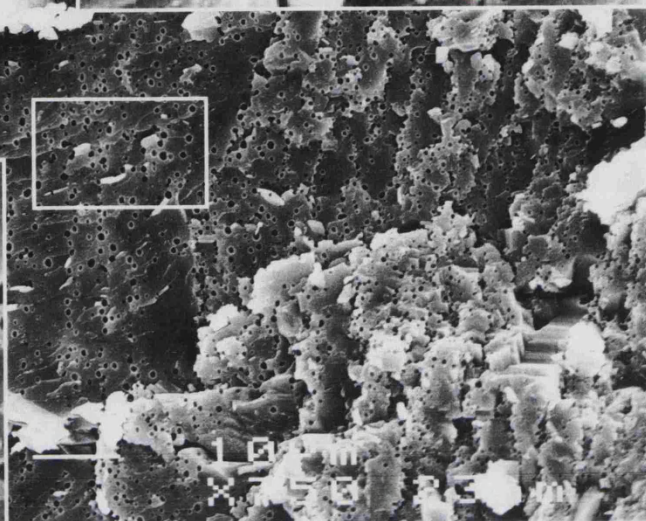
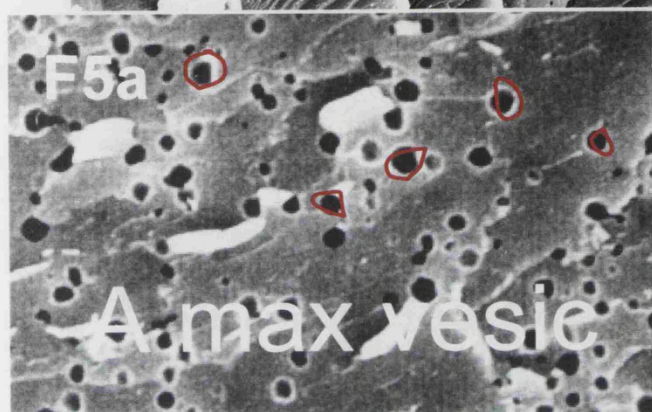
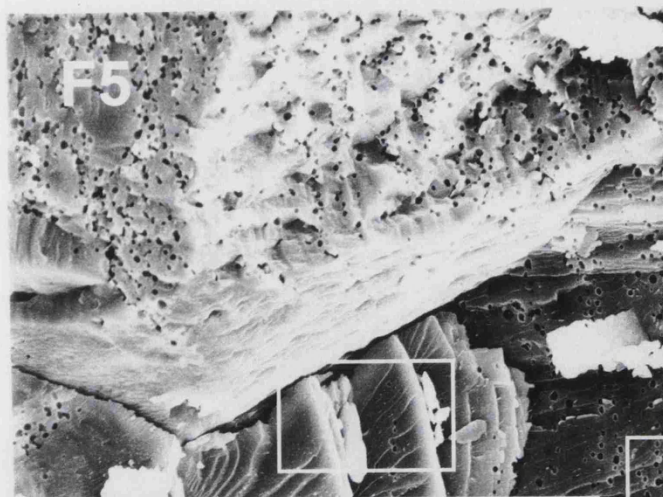


FIGURA 7. Microfotografía mediante microscopía electrónica de barrido de la superficie externa de la membrana testácea externa. Magnificación 1000 X.ó

FIGURA 7a. Detalle del diámetro externo de las fibras de la membrana testácea externa, tomada de la Figura 7.

FIGURA 8. Microfotografía con microscopía electrónica de barrido de la superficie externa de la membrana testácea interna. Magnificación 1000 X.

FIGURA 8a. Detalle del diámetro externo de las fibras de la membrana testácea interna, tomada de la Figura 8.

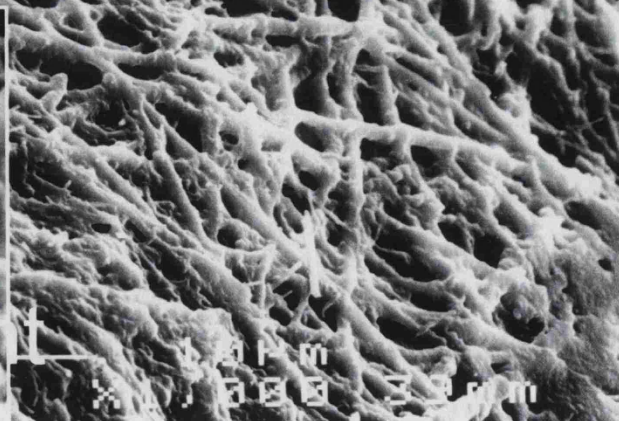
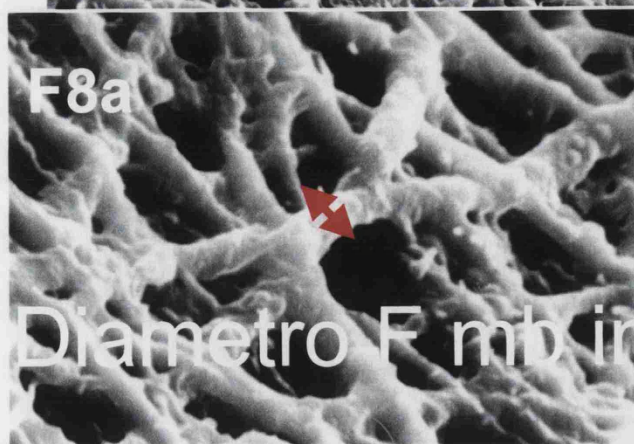
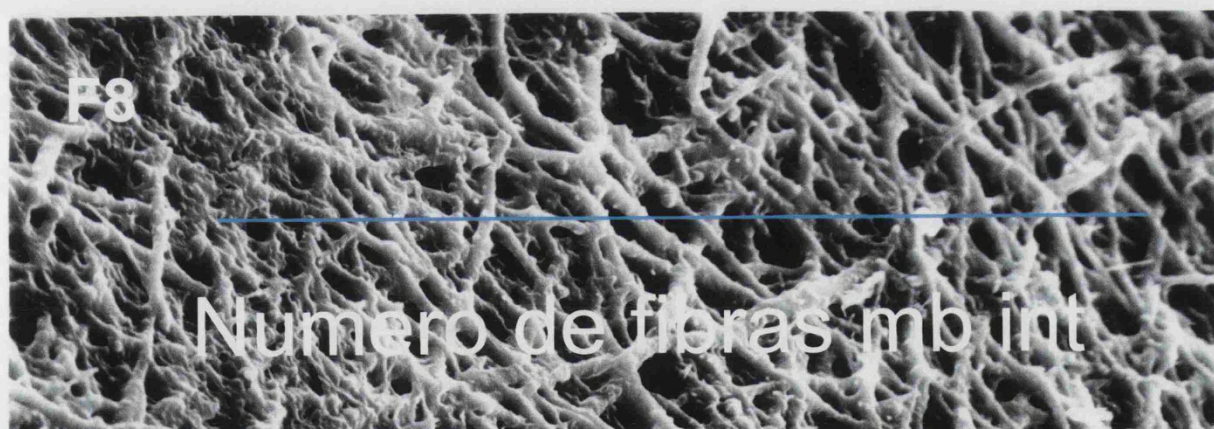
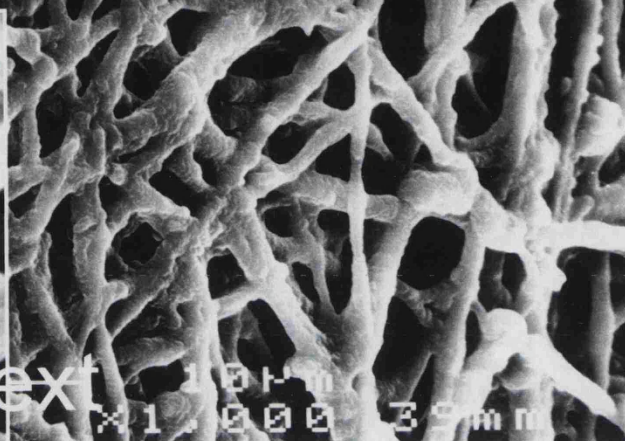
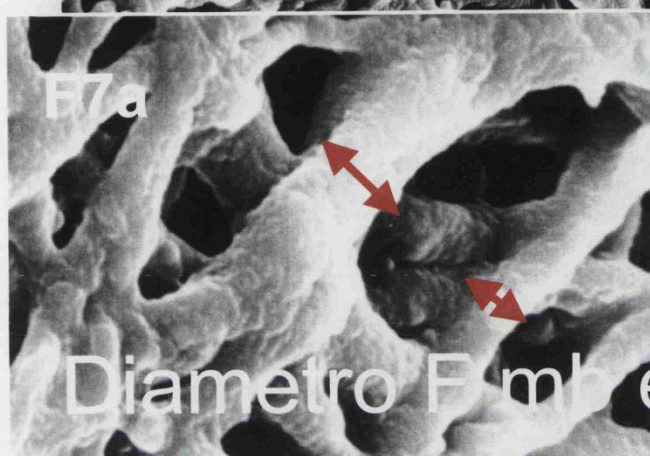
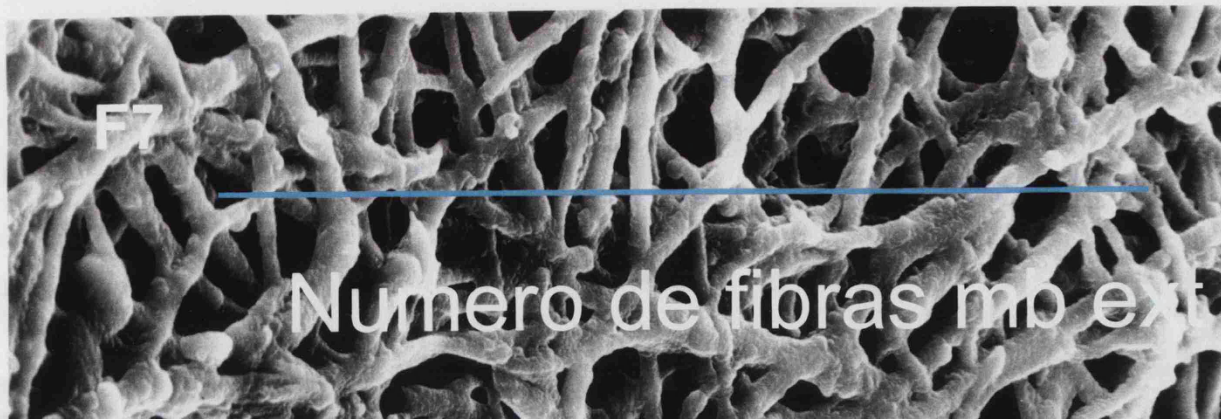


FIGURA 9. Capa albugínea o de cemento albuminoso ligada a la membrana testácea interna del águila perdicera. Magnificación 1000 X.

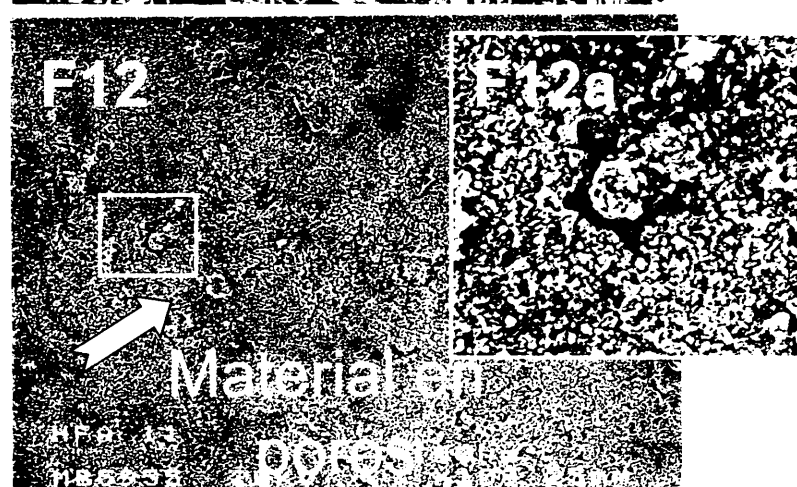
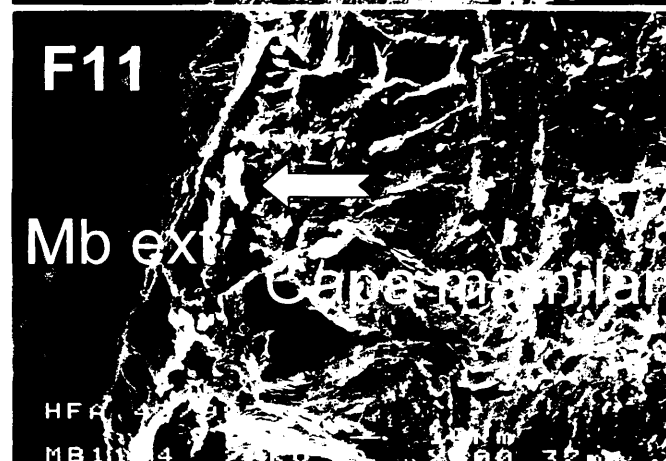
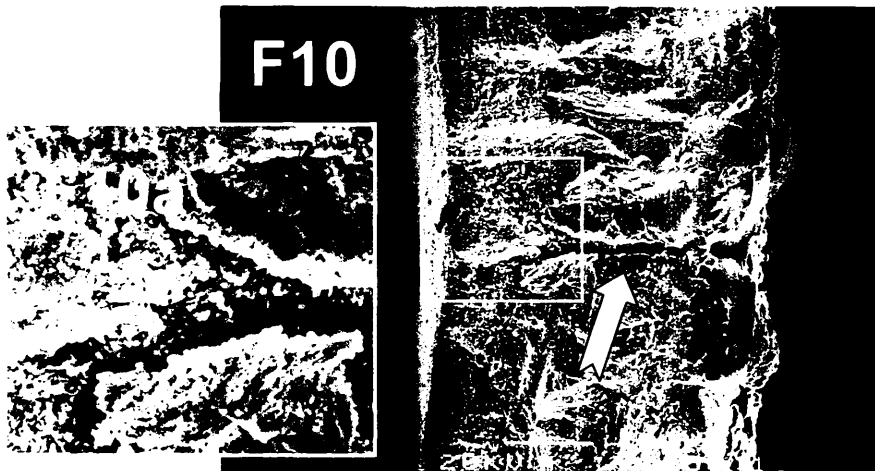
FIGURA 10. Morfología de los canales que atraviesan la cáscara en el águila perdicera. Magnificación 150 X.

FIGURA 10a. Detalle de la porción cónica mas externa, a nivel de la capa de cristalización externa, de los canales que atraviesan la, tomada de la Figura anterior.

FIGURA 11. Zona de unión de los cuerpos mamilares con la superficie externa de la membrana testácea externa. Magnificación 500 X.

FIGURA 12. Presencia de material amorfo obstruyendo los poros situado en la superficie externa de la cáscara. Magnificación 100 X.

FIGURA 12a. Detalle a mayores aumentos tomado de la figura anterior.



FIGURAS 13 y 14. Magnitudes que mantienen una constancia significativa en secciones transversales de cáscaras correspondientes a distintos huevos de un mismo individuo. Magnificación 150 X.

FIGURAS 15 y 16. Deatalle de la distancia entre mamilas en la superficie interna de cáscaras con distribución regular e irregular de las mismas.

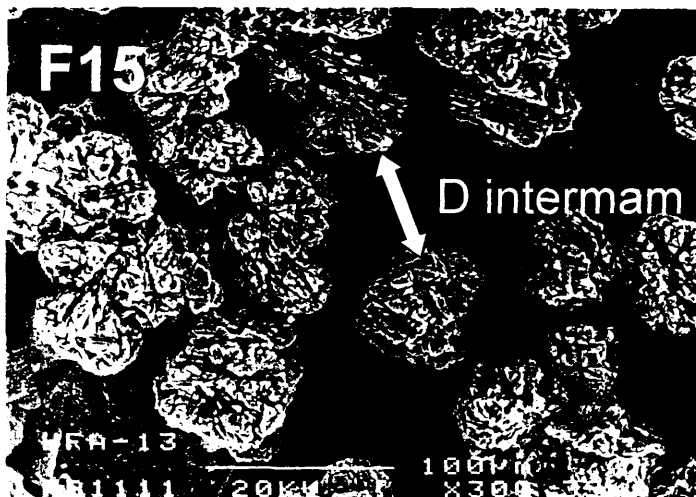
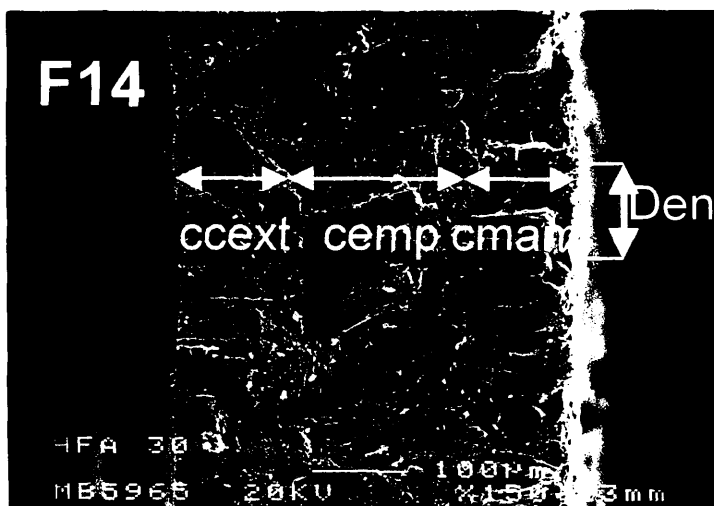
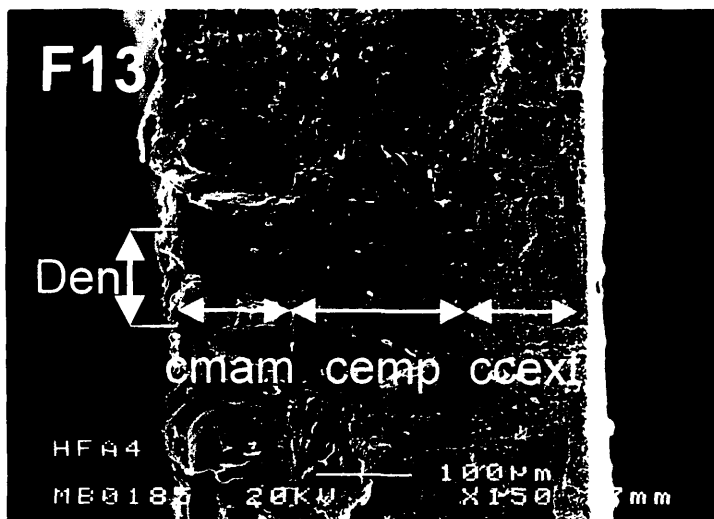
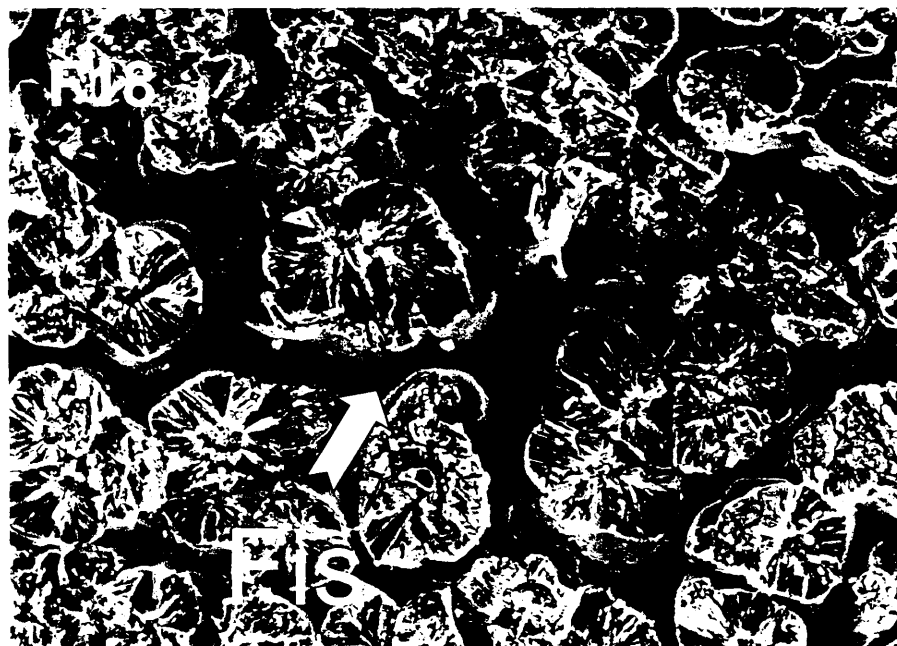
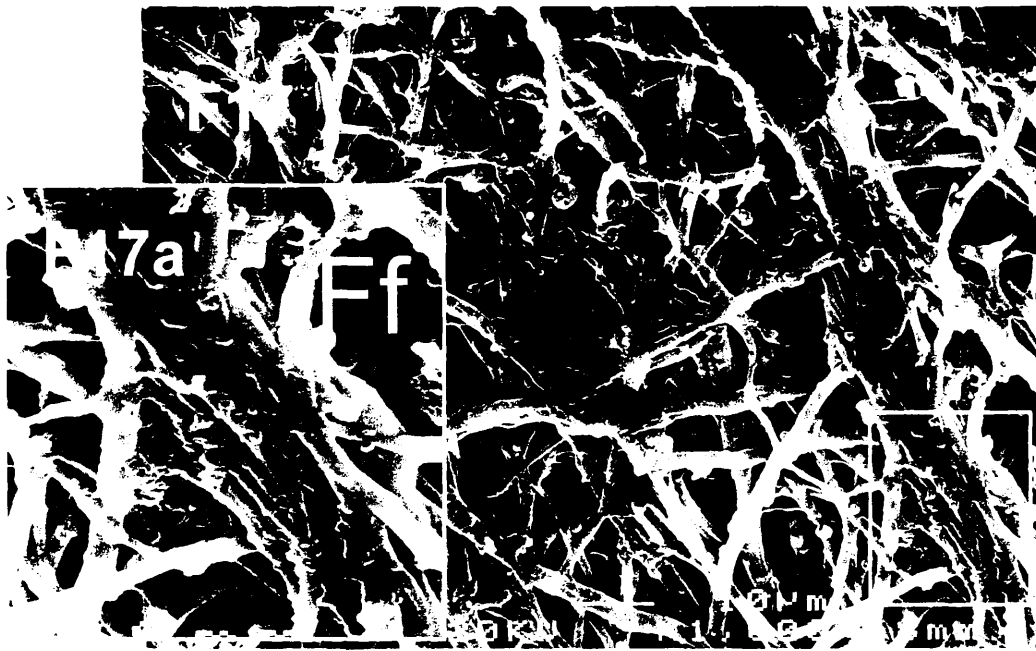


FIGURA 17. Fusión de fibras afectando a la membrana externa de la cáscara en huevos con niveles elevados de DDE. Magnificación 1000 X.

FIGURA 17 a. Detalle a mayores aumentos tomado de la figura anterior.

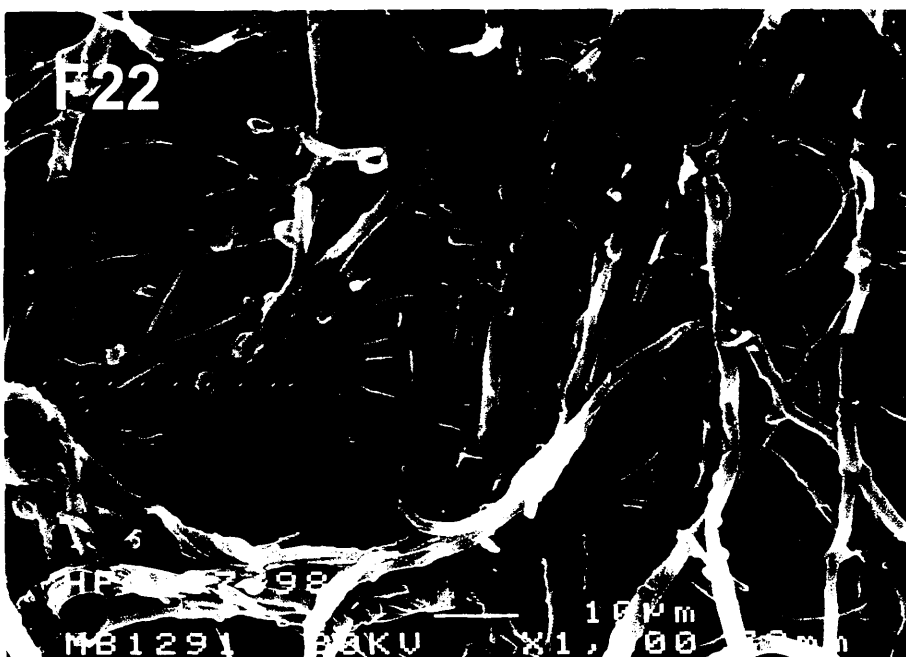
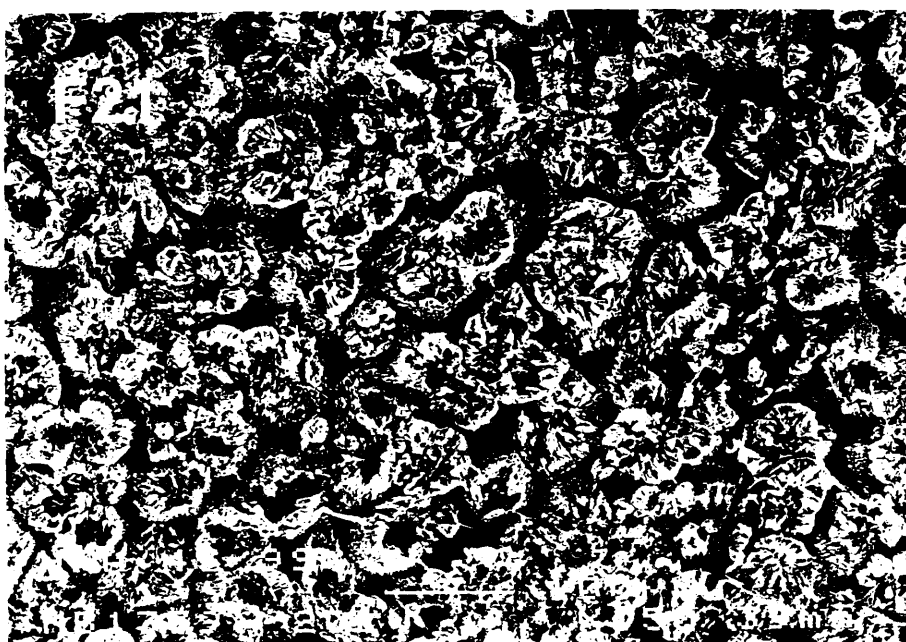
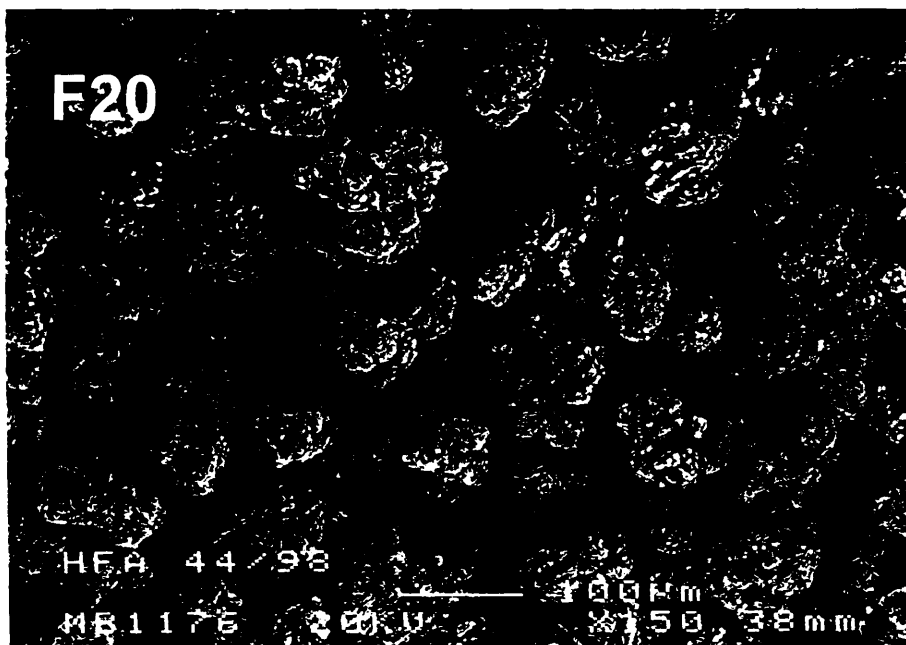
FIGURA 18. Superficie interna de la capa mamilar en la que se aprecia la presencia de una fisura en la base de las mamilas en una muestra que presentaba niveles elevados de Dieldrin y DDE.

FIGURA 19. Aumento significativo del número de poros en la superficie externa de la cáscara en un huevo con niveles elevados de mercurio. Magnificación 100 X.



FIGURAS 20 y 21. Disminución significativa del área de nucleación en cáscaras correspondientes a huevos con niveles elevados de dieldrin (20) en comparación con cáscaras normales (21). Magnificación 150 X..

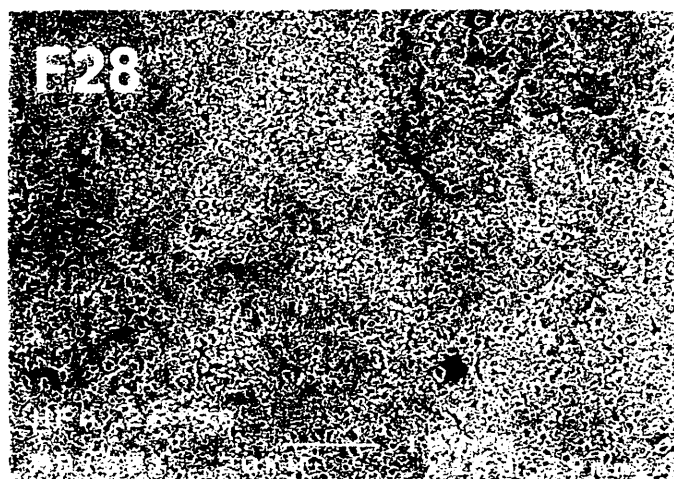
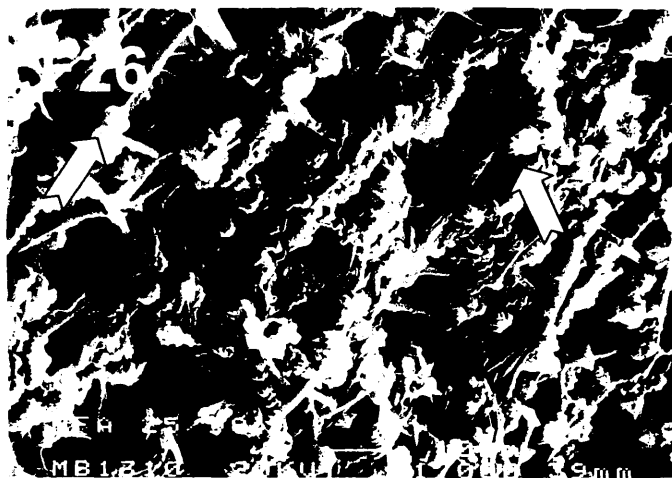
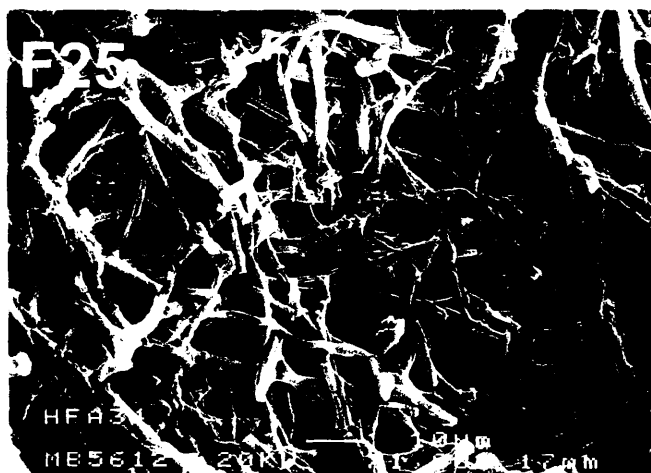
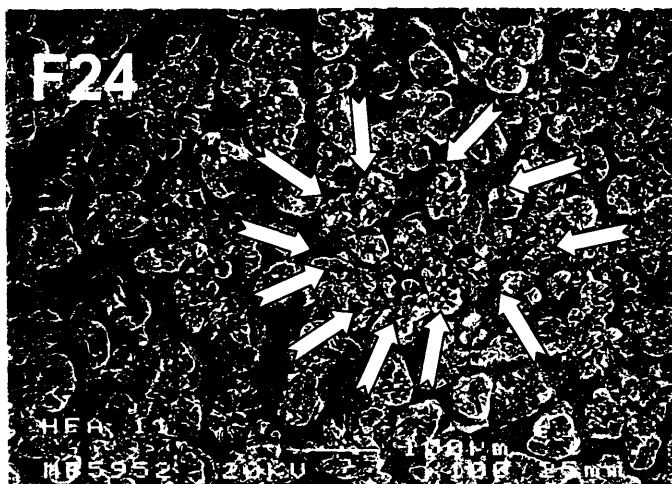
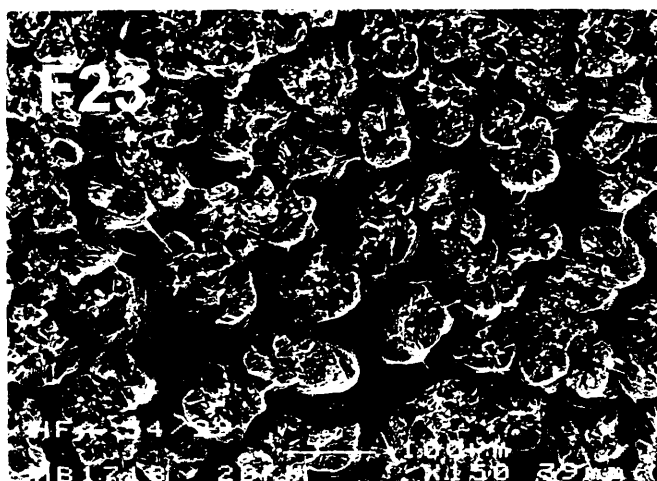
FIGURA 22. Distribución irregular de las fibras de la membrana externa en huevos con contenidos elevados de mercurio. Magnificación 1000 X.



FIGURAS 23 Y 24. Presencia de multinucleación (24) afectando a las mamilas en la superficie interna de algunas muestras procedentes de la población castellana, en comparación con la ausencia de este fenómeno (23) en la población de Algarve. Magnificación 150 y 100 X respectivamente.

FIGURAS 25 y 26. Detalle de la presencia masiva de formaciones globulares presentes en la membrana testácea externa de la cáscara en muestras correspondientes a la población del Algarve (26), en comparación con la ausencia general de estas estructuras en la población castellana (25).

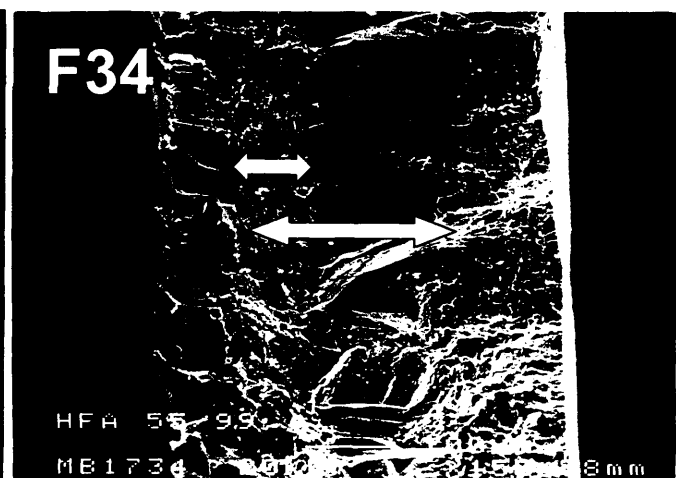
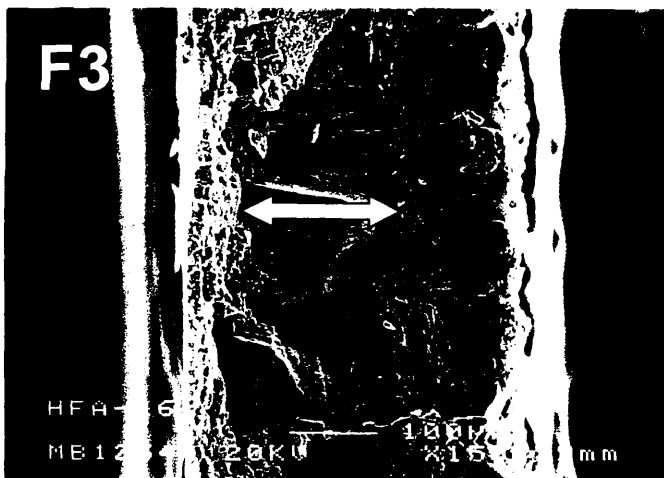
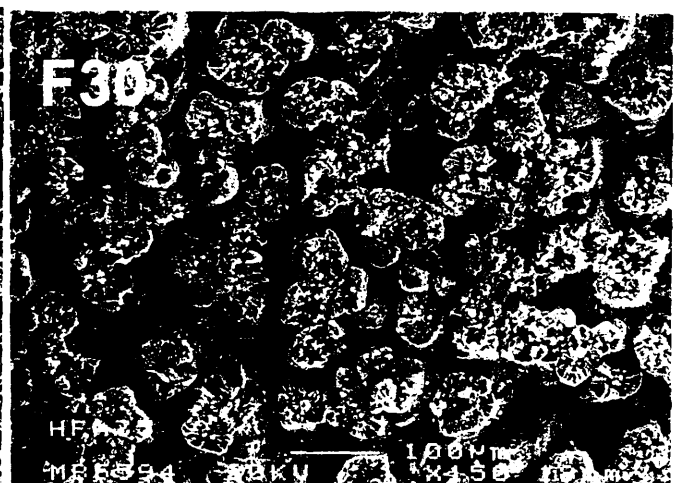
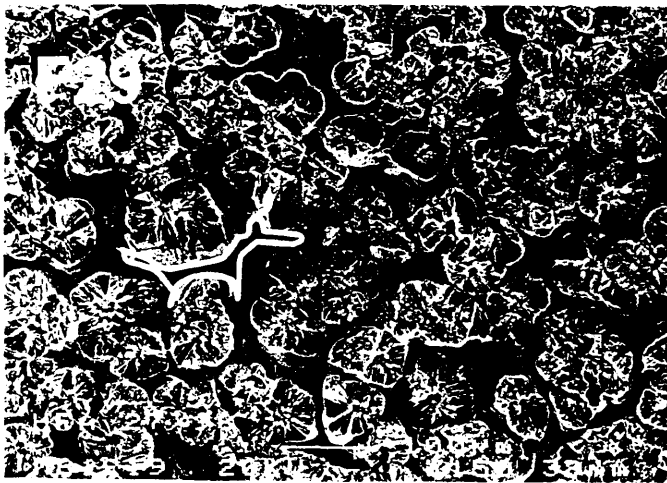
FIGURAS 27 Y 28. Aumento significativo del número de poros a nivel de la superficie externa de la cáscara en muestras correspondientes a la población Castellano-Manchega (28), en comparación con muestras control de la misma población (27). Magnificación 150 X.



FIGURAS 29 y 30. Aumento del espacio entre bases de las mamilas en muestras correspondientes a la población del Duero (29) en comparación con cáscaras control de la población castellana (30). Magnificación 150 X.

FIGURAS 31, 31a, 32 y 32a.. Disminución del número de vesículas presentes tanto en el área mínima (32^a), como en el área máxima en la población Castellano-Manchega (32), en relación con los mismos parámetros en cáscaras control de la población del Algarve (31 y 31a).

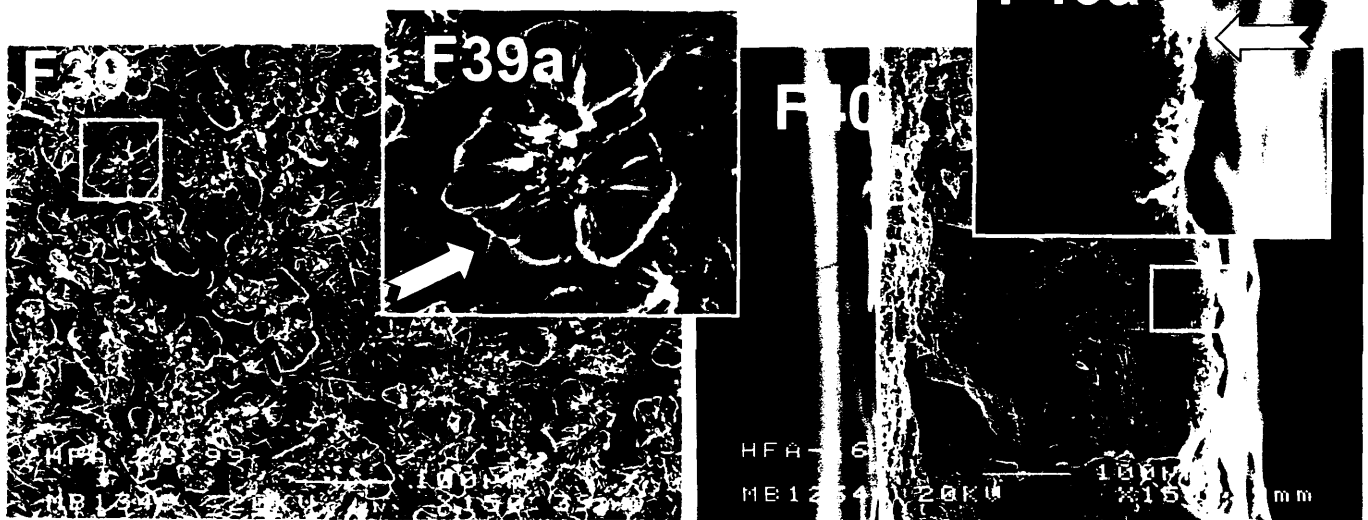
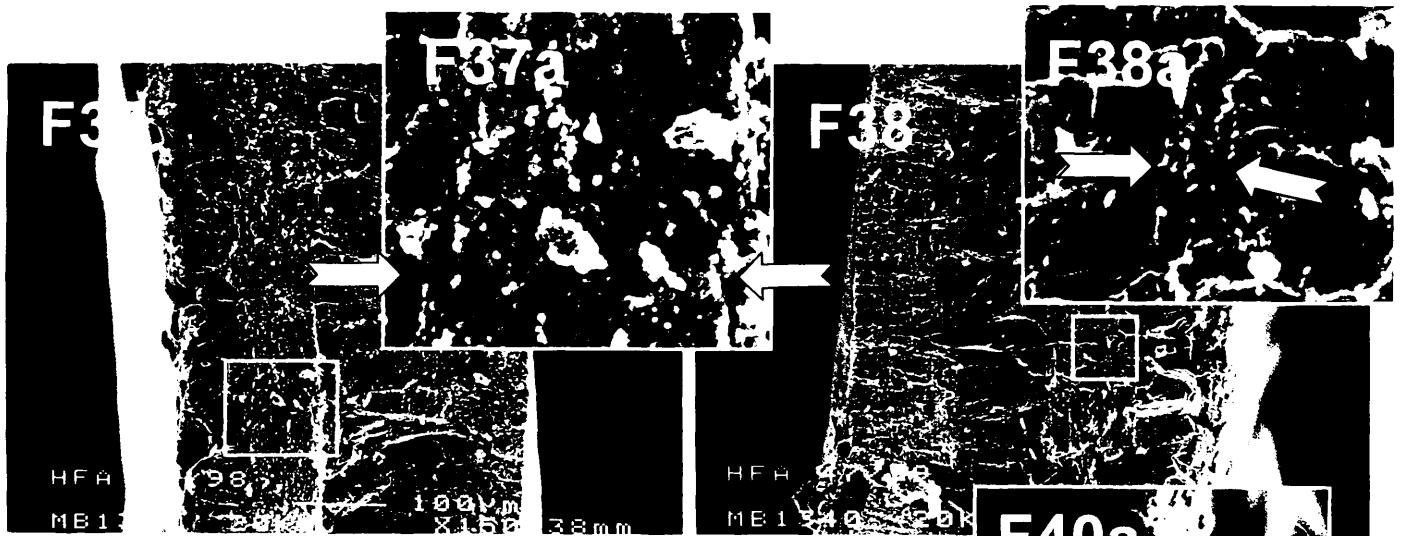
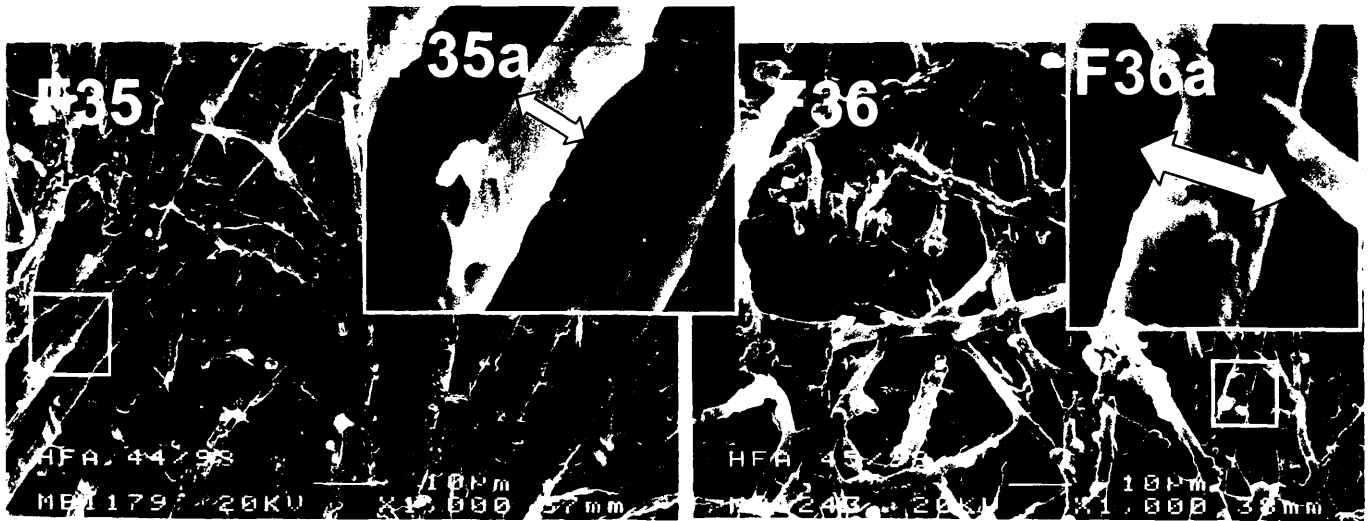
FIGURAS 33 y 34. Disminución significativa del grosor de la capa de empalizada en muestras correspondientes a la población castellana (33) en comparación con las muestras de la población del Algarve (34). Magnificación 150 X.



FIGURAS 35, 35a, 36 y 36a. Variaciones individuales en el grosor de las fibras de la membrana externa de la cáscara de etiología desconocida. Magnificación 150 X.

FIGURAS 37, 37^a, 38 y 38a. Presencia y grosor máximo de la cristalización amorfa a nivel de la base de la capa de empalizada en muestras procedentes de la población del Algarve portugués (37 y 37a), en comparación con la ausencia de esta capa o formas vestigiales en la población Castellano-Manchega (38 y 38a). Magnificación 150 X.

FIGURAS 39, 39^a, 40 y 40a. Diferentes grados de adherencia de la membrana externa de la cáscara a la capa mamilar. Máximo (39 y 39a) y mínimo (40 y 40a), con ausencia de restos de membrana ligada a la base de la mamila. Magnificación 150 X.



FIGURAS 41, 41a, 42 y 42a. Variación en cuanto a la morfología de las mamilas: de cónicas (41 y 41a) a planas (42 y 42a).

FIGURAS 43 Y 44. Variación individual en el número de poros a nivel de la superficie externa de la cáscara. Magnificación 100 y 150 X.

FIGURAS 45, 45a , 46 y 46a. Variaciones individuales en el grado de cristalización: correcto (45 y 45a) y deficiente (46 y 46a). Magnificación 150 X.

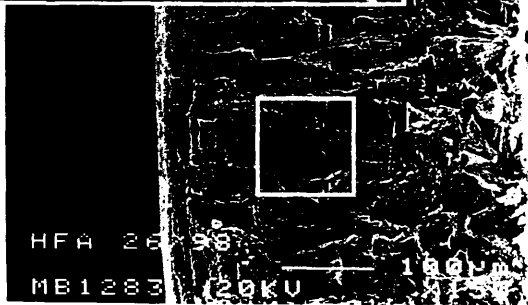
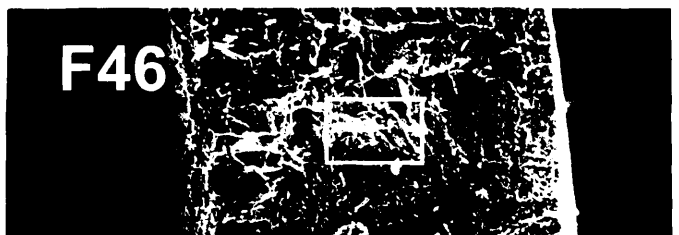
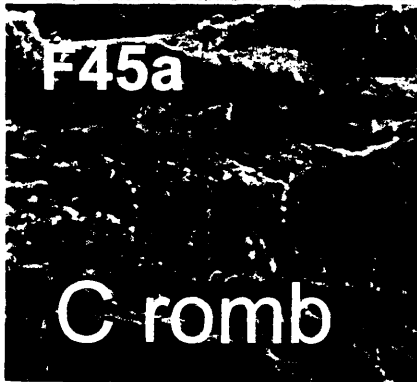
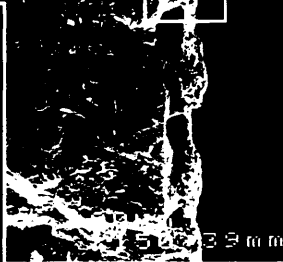


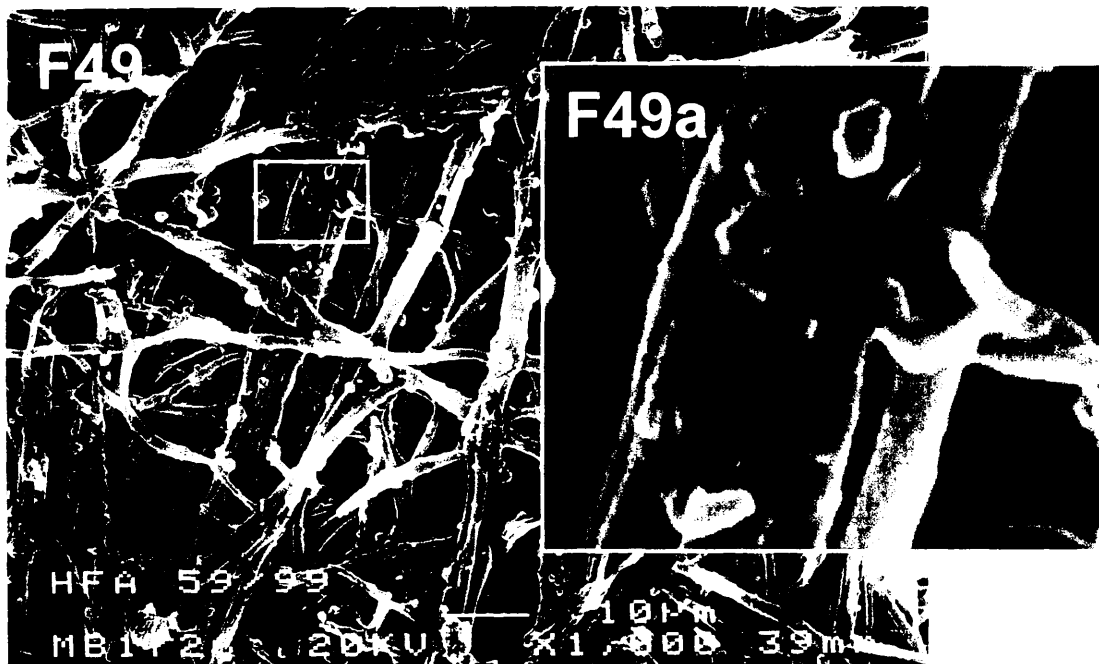
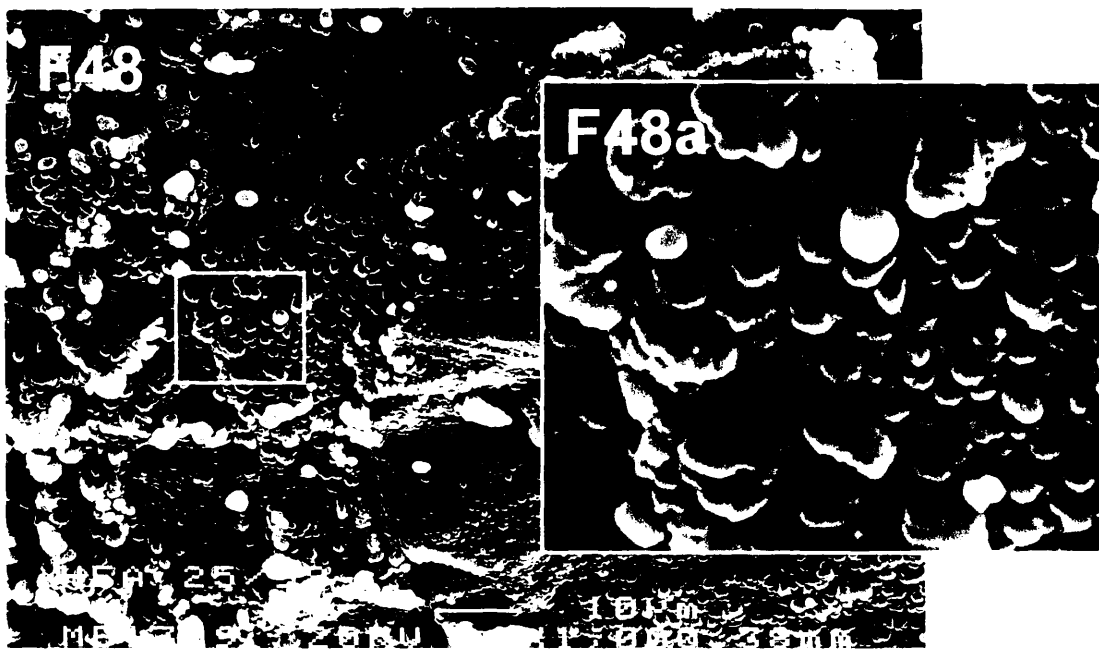
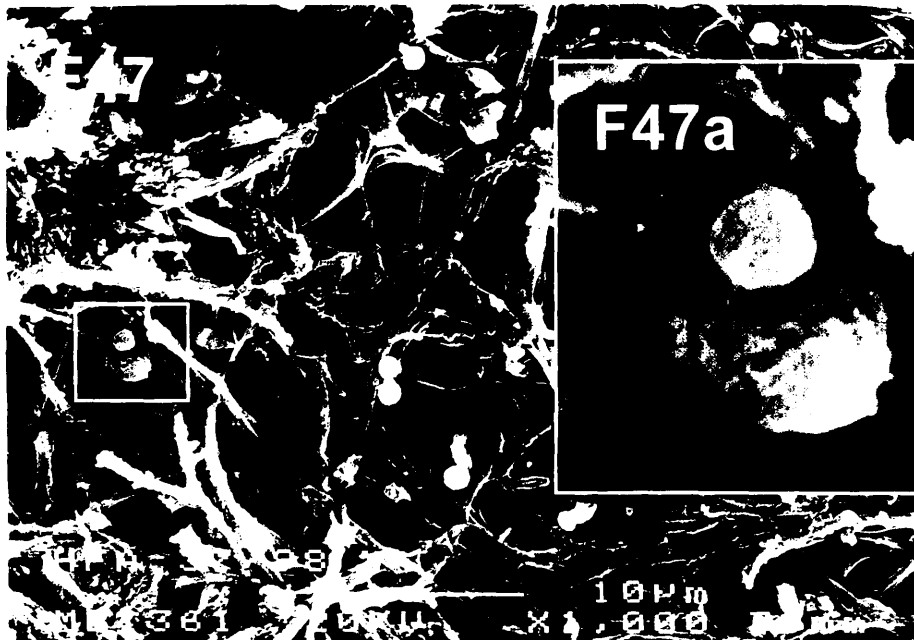
FIGURA 47. Presencia de estructuras globulares en las membranas testáceas correspondientes a muestras procedentes de la región de Algarve. Magnificación 1000 X.

FIGURA 47a. Detalle de las estructuras globulares presentes en las membranas testáceas correspondientes a muestras procedentes de la región de Algarve. Tomada de la Figura 47.

FIGURA 48. Presencia extensa de formaciones globulares extendiéndose por la capa de empalizada y en relación con la presencia de la capa adicional en la base de la misma, en un caso extremo detectado en el Algarve portugués. Magnificación 1000 X.

FIGURA 48a. Detalle de las formaciones globulares extendiéndose por la capa de empalizada y en relación con la presencia de la capa adicional en la base de la misma, en un caso extremo detectado en el Algarve portugués. Tomada de la Figura 48.

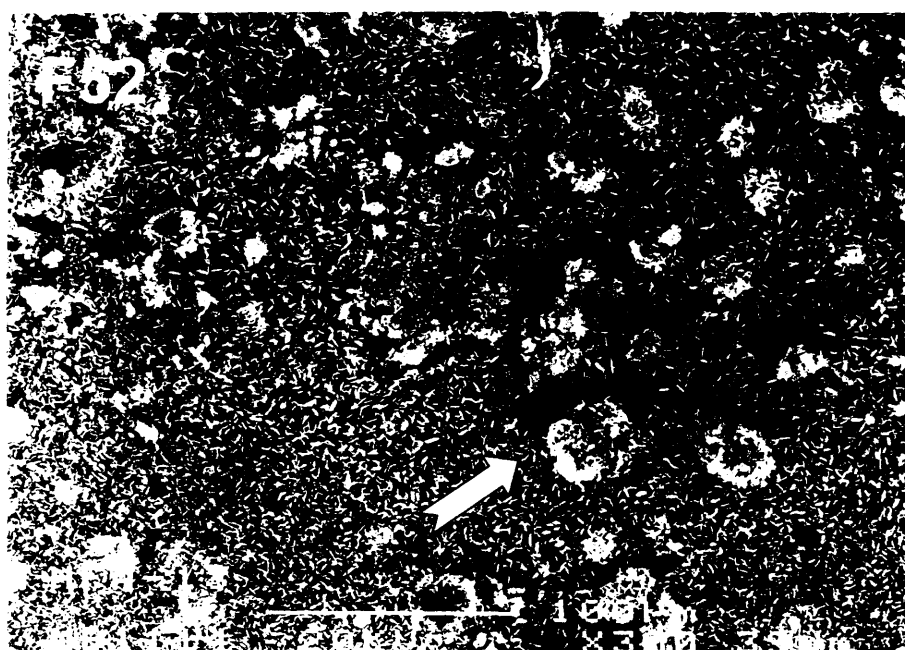
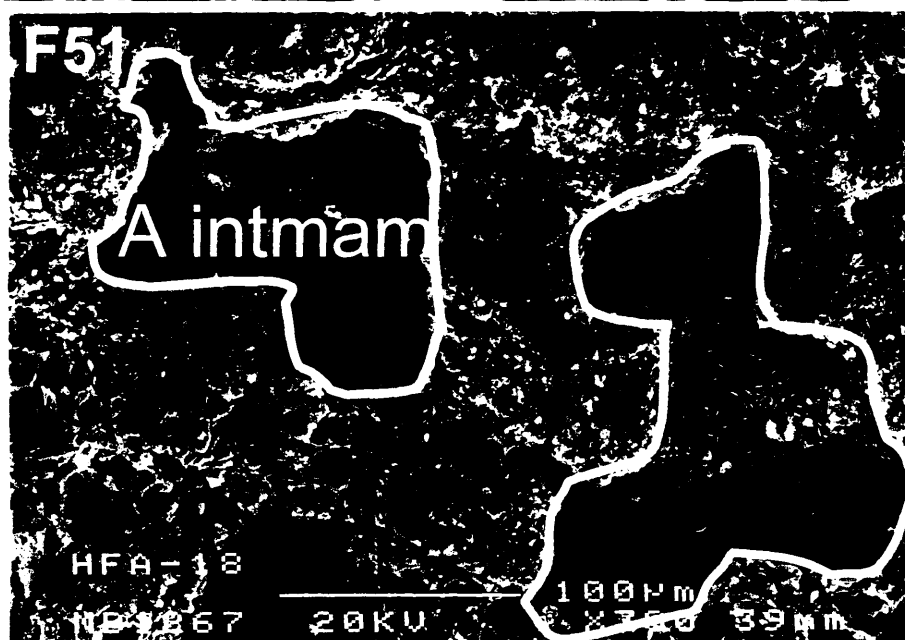
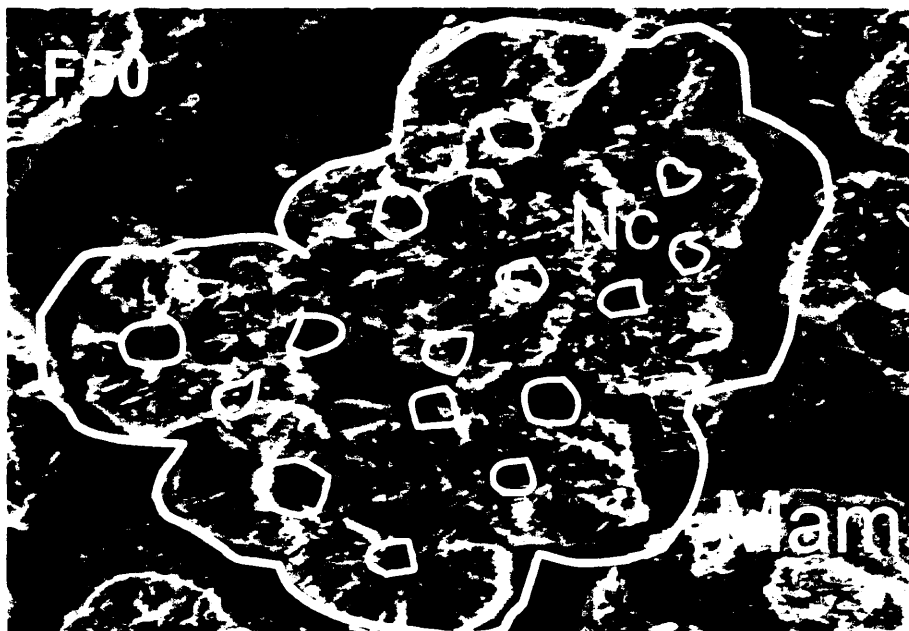
FIGURA 49 y 49a. Fusión de fibras afectando a muestras procedentes de la población castellano manchega en las que se detectaron niveles elevados de mercurio. Magnificación 1000 X. Detalle de la fusión (49a).



FIGURAS 50. Fenómeno de multinucleación.

FIGURA 51. Distribución anómala de mamilas con aumento del espacio intermamilar.

FIGURA 52. Esferolitos presentes en la superficie externa de la cáscara.

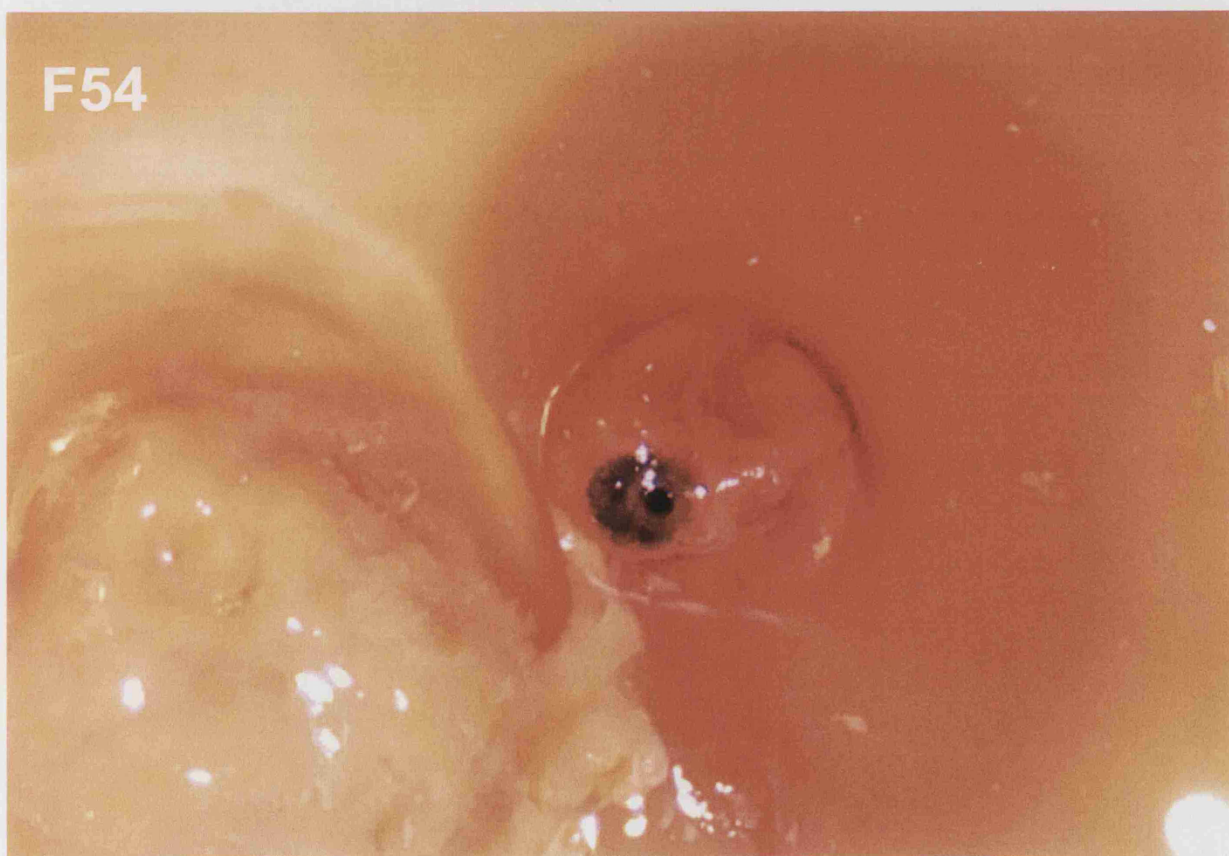


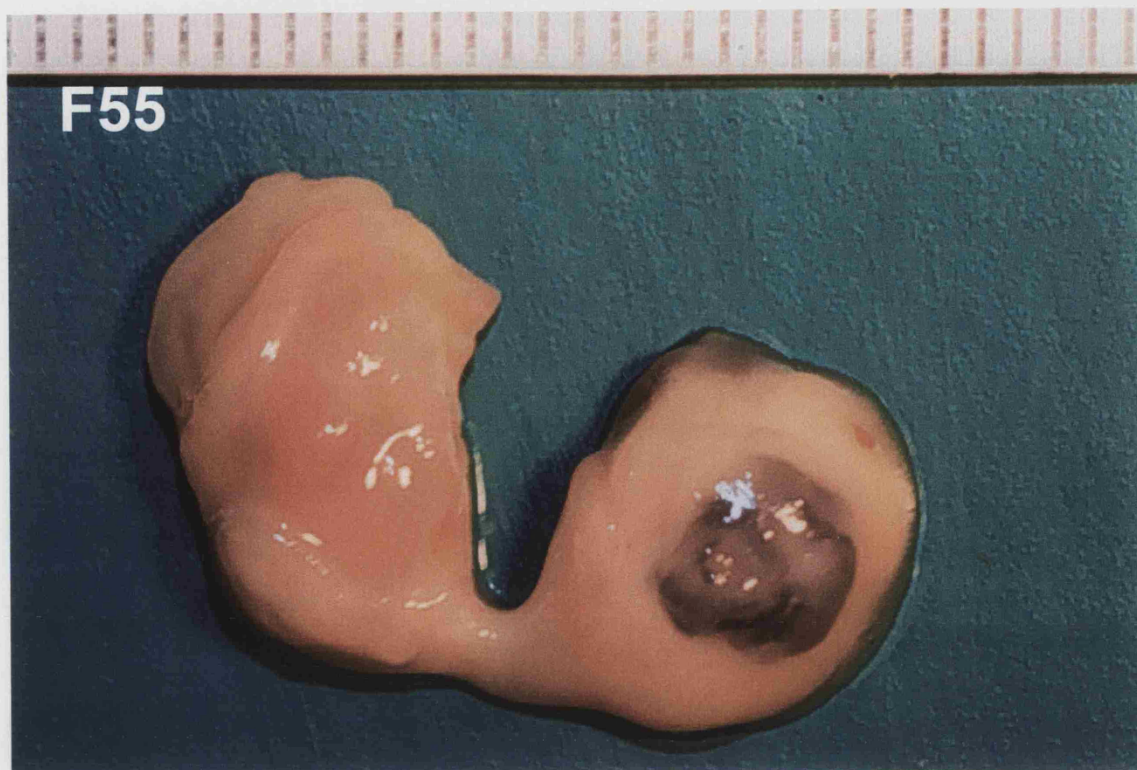
FIGURAS 53 a 60 inclusives. Embriones de águila perdicera de 5, 7,8-9, 11-12, 15, 28-29, 33-35,38-39 días de edad respectivamente.

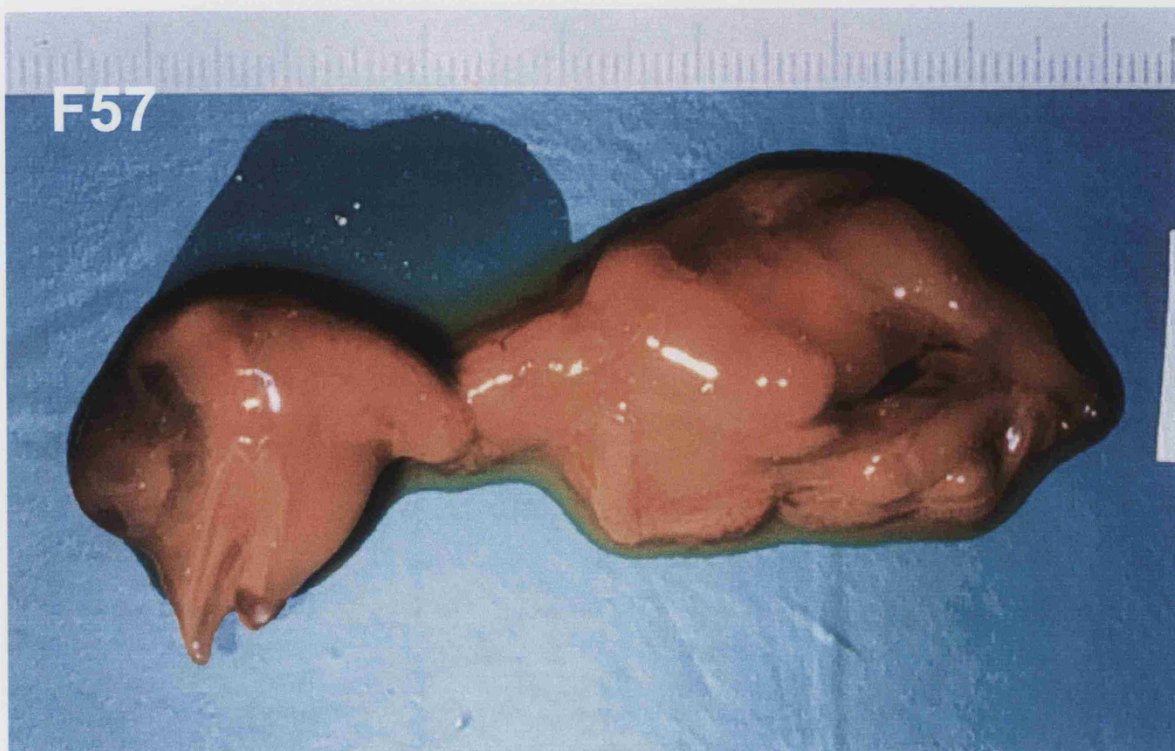
F53



F54







F59



F60

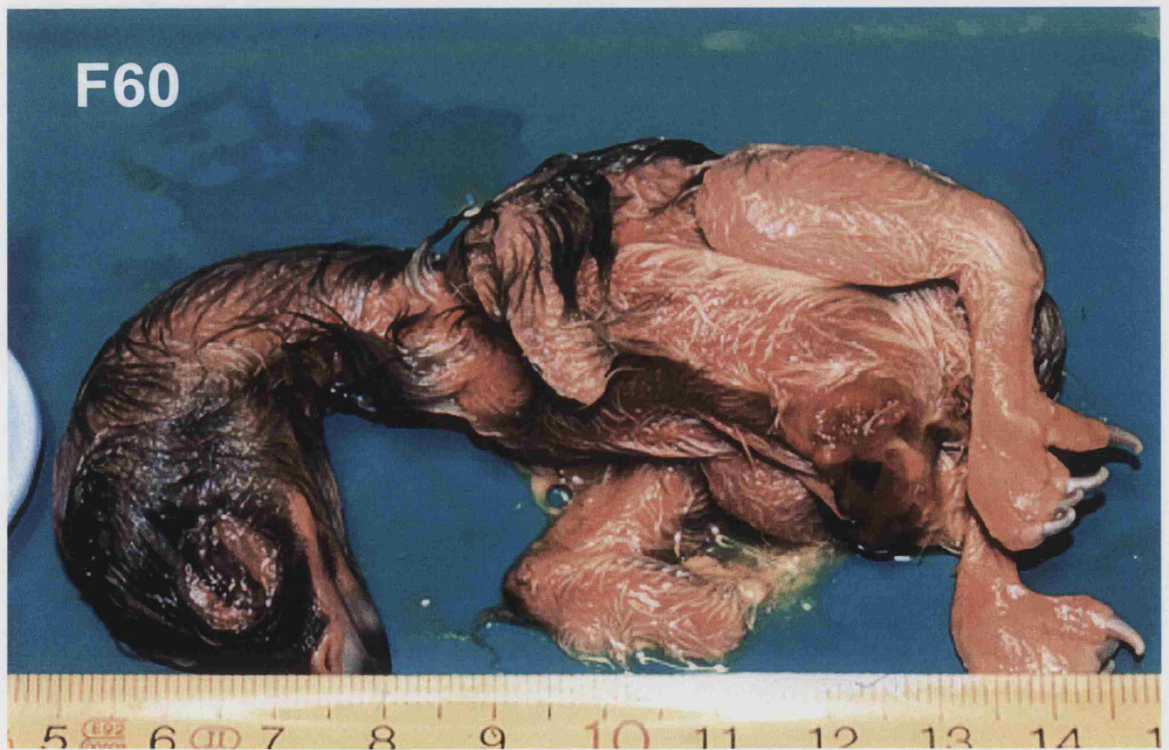


FIGURA 61. Embrión de águila perdicera mostrando asimetría de extremidades.

FIGURA 62. Embrión de águila perdicera mostrando petequias como resultado de un proceso septicémico de etiología bacteriana.

